

**A szabadidős mozgás kardiovaszkuláris
és vastagbélgyulladást csökkentő hatása patkányban:
a hem-oxigenáz és a nitrogénmonoxid-szintáz enzimek szerepe**

Ph.D. értekezés

Szalai Zita

Témavezetők:

Dr. Varga Csaba

egyetemi docens

Dr. Pósa Anikó

egyetemi tanársegéd

Kedvesné Dr. Kupai Krisztina

tudományos munkatárs

Biológia Doktori Iskola

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

SZTE, TTIK

2014

SZEGED

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Tudományos háttér.....	7
1.1. Problémafelvetés.....	7
1.2. A fizikai aktivitás és az edzés fogalma, típusai.....	7
1.3. Szabadidős testmozgás modellezése futókerékkel	8
1.4. A mozgás okozta oxidatív stresszre adott válasz	9
1.5. A fizikai aktivitás befolyásolja a gyulladásos markerek szintjét	10
1.6. Gyulladásos jelmolekulák a bélrendszerben	11
1.7. A hem-oxigenáz enzimrendszer	14
1.8. A nitrogénmonoxid-szintáz enzimrendszer.....	18
1.8.1. NOS izoformák a béltraktusban.....	20
1.8.2. NOS izoformák a kardiovaszkuláris rendszerben	24
1.8.3. A fizikai aktivitás hatása a NOS izoformákra a kardiovaszkuláris rendszerben	27
2. Célkitűzések	30
3. Anyagok és módszerek	32
3.1. Patkány aortagyűrű kontrakció kísérletek.....	32
3.1.1. Felhasznált állatok.....	32
3.1.2. Nőstény patkányok ivari ciklusának meghatározása Giemsa festéssel.....	32
3.1.3. Patkány aortagyűrű-kontrakció ex vivo vizsgálata	33
3.2. Szabadidős testmozgás kísérletek – kardiovaszkuláris rendszer vizsgálata	34
3.2.1. Felhasznált állatok.....	34

3.2.2. Szabadidős testmozgás modellezése	34
3.3 Szabadidős testmozgás kísérletek – vastagbélgyulladás vizsgálata	35
3.3.1. Felhasznált állatok.....	35
3.3.2. Kísérletek menete.....	35
3.3.3. Vastagbélgyulladás kiváltása	37
3.3.4. Nyálkahártya-gyulladás makroszkópikus paramétereinek vizsgálata	37
3.4. Enzimaktivitások mérése	38
3.4.1. MPO aktivitásmérés	38
3.4.2. HO aktivitásmérés	39
3.4.3. NOS aktivitásmérés.....	40
3.4.4. Fehérjetartalom mérése Bradford mikromódszerrel	41
3.5. Statisztikai analízis	41
3.6. Felhasznált anyagok.....	41
4. Eredmények	42
4.1. HO rendszer szerepe az érendotélium vazodilatációjában.....	42
4.2. A HO aktivitásának változása 6 hetes szabadidős testmozgás hatására aortában és szív bal kamrában	43
4.3. A cNOS aktivitásának változása 6 hetes szabadidős testmozgás hatására aortában és szív bal kamrában	44
4.4. Az állatok testtömegének változása futás és TNBS kezelés hatására	45
4.5. Makroszkópikus gyulladás paraméterek a 3, 6 és 10 hetes futást követő TNBS kezelés hatására	47

4.6. A MPO aktivitásának változásai 6 és 10 hetes futást követő TNBS kezelés hatására	49
4.7. A HO aktivitásának változása a TNBS kezelés és/vagy a 6 hét futás hatására patkány vastagbélben	50
4.8. A cNOS és az iNOS aktivitásának változása a TNBS kezelés és/vagy a 6 hét futás hatására patkány vastagbélben	51
5. Megbeszélés	53
6. Következtetések	61
7. Összefoglalás	63
8. Summary	67
9. Köszönetnyilvánítás	71
10. Irodalomjegyzék	72
11. Közlemények listája	87

Rövidítések jegyzéke

AVP	arginin-vazopresszin
Ca ²⁺	kalcium
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
cNOS	konstitutív nitrogénmonoxid-szintáz
CO	szén-monoxid
CRP	C-reaktív protein
CXCL1	kemokin (C-X-C motívum) ligand-1
EGTA	etilén-glikol-bis (β-aminoetil éter) tetraecetsav
eNOS	endoteliális nitrogénmonoxid-szintáz
GTP	guanozin-trifoszfát
HO	hem-oxigenáz enzim
HO-1	hem-oxigenáz-1
HO-2	hem-oxigenáz-2
HO-3	hem-oxigenáz-3
IBD	gyulladásos bélbetegségek (inflammatory bowel diseases)
IL-1β	interleukin-1β
IL-1ra	interleukin-1 receptor antagonista
IL-4	interleukin-4
IL-6	interleukin-6
IL-10	interleukin-10
iNOS	indukálható nitrogénmonoxid-szintáz

LNNA	N ω -nitro-L-arginin-metilészter
MPO	mieloperoxidáz enzim
NADPH oxidáz	nikotinamid adenin dinukleotid foszfát oxidáz enzim
nNOS	neuronális nitrogénmonoxid-szintáz
NO	nitrogénmonoxid
NOS	nitrogénmonoxid-szintáz enzim
Nrf2	NF-E2 kapcsolt faktor 2
PKG	protein kináz G
RONs	reaktív oxigén és nitrogén származékok
sGC	szolubilis guanilát cikláz
SnPP	ón-protoporfirin IX
SOD	szuperoxid-dizmutáz enzim
TNBS	2,4,6-trinitrobenzén-szulfonsav
TNF- α	tumor nekrosis faktor- α

1. Tudományos háttér

1.1. Problémafelvetés

A mozgásról számos krónikus betegség esetén – II. típusú diabetes mellitus, krónikus obstruktív tüdőbetegség, koszorúér betegség - feltételezik, hogy jótékony hatással bír (Colberg, Sigal et al. 2010, Butts, Belfer et al. 2013, Wienbergen and Hambrecht 2013). Még további kutatásokat igényel azonban az, hogy teljes képet kapjunk arról, hogy a mozgás milyen mechanizmusokon keresztül fejti ki pozitív hatását a szív- és érrendszerben. Tisztázásra vár az is, hogy az előzetesen végzett fizikai aktivitás az emésztőrendszerben kialakuló gyulladásra milyen hatással van. Ismert ugyanis, hogy mozgás során lecsökken a hasi vérellátás, ami extrém esetekben, mint a maratonséta vagy az atlétika súlyos, görcsöléssel, puffadással, hasmenéssel, hányással járó tüneteket okozhat, ugyanakkor a mozgásnak megelőző szerepe van a vastagbél-daganatok kialakulásában (Aoi, Naito et al. 2010, van Wijck, Lenaerts et al. 2012). Azonban kevés információ áll rendelkezésünkre azokról a molekuláris útvonalakról, amelyek szerepet játszhatnak a mozgás hatásának közvetítésében a béltraktusban.

1.2. A fizikai aktivitás és az edzés fogalma, típusai

A szakirodalom megkülönbözteti a “physical activity” és az “exercise” fogalmát. *Fizika aktivitás* alatt értünk minden olyan mozgásformát, amelyet a vázizomzat hajt végre energia ráfordításával. A fizikai aktivitás alkategóriáit több szempont alapján határozhatjuk meg: a mozgás célja, mennyisége és típusa. A fizikai aktivitás célja alapján elkülönítünk: szabadidős/ rekreációs, továbbá a mindennapokkal - foglalkozással, közlekedéssel,

háztartással és a napi tevékenységekkel - járó testmozgást, illetve az edzést. Az “exercise”, edzés tervezett, strukturált fizikai aktivitás, a fizikai fittség egy vagy több komponensének – úgy mint testfelépítés, hajlékonyság, izomerő, állóképesség, aerob kapacitás – megtartása vagy fejlesztése érdekében végrehajtott ismétlődő mozgásforma (Zanuso, Jimenez et al. 2010). A *szabadidős vagy rekreációs testmozgás* magába foglal minden belső motivációból, kedvtelésből, a szabadidő aktív eltöltése érdekében végzett mozgásformát, ami felüdülést, jó közérzetet ad, segít megőrizni az egészséget. A fizikai aktivitás mennyiségét a mozgás intenzitása (kis, mérsékelt és nagy intenzitás), időtartama és gyakorisága együtt adják meg. A mozgás típusa alapján lehet aerob és anaerob edzés, erő, illetve hajlékonyság fejlesztése céljából végzett fizikai aktivitás (Committee 2008).

1.3. Szabadidős testmozgás modellezése futókerékkel

Rágcsálóknál a fizikai aktivitás modellezésére általában a futópadot, a futókereket és az úszást használják. A futópad és az úszás esetén protokollban meghatározott a mozgás időtartama, gyakorisága, illetve futópadnál a mozgás intenzitása is, így ezek a mozgásformák az edzést modellezik, kivitelezhetőek velük a különböző edzéstípusok: aerob, anaerob mozgás és erőnléti edzés (Davis, Moriguchi et al. 2013). Ezzel szemben a futókerék az állatok ketrecének része, így a rágcsálók saját maguk „szabályozhatják” a futás időtartamát, gyakoriságát és intenzitását. Ez a mozgásforma párhuzamba állítható a szabadidős testmozgással (Takeshita, Horiuchi et al. 2012). Előnye, hogy az állatok a cirkadián ritmusuk szerint végeznek fizikai aktivitást (a rágcsálók éjjel aktívak) (Verwey, Robinson et al. 2013), a megszokott környezetükben futnak a kísérletet végző személy jelenléte nélkül, illetve semmilyen mozgásra kényszerítő tényező nem szükséges. Ezek a

körülmények csökkentik a stresszt, így különböző stresszre indukálódó faktorok vizsgálatára is alkalmas ez a modell (Brocardo, Boehme et al. 2012).

1.4. A mozgás okozta oxidatív stresszre adott válasz

Az 1980-as évek elején két kutatócsoport is leírta, hogy az összehúzódnásokat végző vázizom szabadgyököket termel, melyek szövetkárosító hatásúak (Davies, Quintanilha et al. 1982, Jackson, Jones et al. 1983). Az 1990-es években folyó kísérletek feltárták, hogy az antioxidáns enzimek aktivitása, oxidatív stresszre adott válaszként, megváltozik mozgás következtében (Ji, Fu et al. 1992, Criswell, Powers et al. 1993). További kutatások bizonyították, hogy a mozgás során keletkező reaktív oxigén és nitrogén származékoknak (RONS) károsító hatásuk mellett fontos szerepük van a sejt-szignalizációs útvonalak módosításában, illetve a redox-érzékeny transzkripció faktorok szabályozásában (Powers and Jackson 2008).

Dean Jones meghatározása szerint az oxidatív stressz definiálásánál a prooxidáns és a vele ellentétes jelentésű antioxidáns fogalmakból kell kiindulni, így az oxidatív stressz alatt a redox szignalizációban és redox kontrollban bekövetkező zavart értjük (Jones 2006). A sejtekben lezajló oxidatív stressz során prooxidáns túlsúly érvényesül az antioxidáns védekező folyamatokkal szemben, melyet a következőkkel jellemezhetünk:

- 1) nagyobb mértékben keletkeznek szabadgyökök és egyéb oxidált molekulák
- 2) csökken a kis molekulasúlyú és/vagy lipidoldékony antioxidánsok mennyisége
- 3) a sejtszintű redox-egyensúly felborul

- 4) egyes sejtalkotók - mint például a lipidek, fehérjék, DNS, RNS - oxidatív károsodást szenvednek.

E négy kategóriába tudjuk besorolni az oxidatív stressz biomarkereit, meghatározásukkal következtethetünk a sejtben lejátszódó eseményekre. A biomarkerek mérését azonban számos tényező befolyásolhatja, illetve metodikai nehézségekbe ütközik, így jelenleg még nincs olyan módszer, mellyel az oxidatív stressz mértékét teljes pontossággal meg lehetne határozni (Powers and Jackson 2008). Fizikai aktivitás során a RONS főként a működő harántcsíkolt izmokban és a szívizomban keletkeznek, valamint a fehérvérsejtekben és a tüdőben is képződnek (Powers and Jackson 2008, Dong, Chen et al. 2011).

1.5. A fizikai aktivitás befolyásolja a gyulladásos markerek szintjét

A vázizomzat működése során citokineket és egyéb jelmolekulákat szabadít fel, melyeket összefoglaló néven miokineknek nevezünk. Ezek a keringésbe jutva közvetítik a mozgás jótékony hatását a különböző szervekhez. A fizikai aktivitásra adott válaszként elsőként az interleukin-6 (IL-6) szintje emelkedik meg a vérben a mozgás intenzitásától, időtartamától függő mértékben, ezt követően megnő az interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) és a gyulladáscsökkentő citokinek közül az interleukin-4 (IL-4) és az interleukin-10 (IL-10) mennyisége (Pedersen and Febbraio 2008, Ostapiuk-Karolczuk, Zembron-Lacny et al. 2012), míg a gyulladáskeltő C-reaktív protein (CRP) szintje csökken mérsékelt intenzitású mozgás hatására (Arikawa, Thomas et al. 2011, Al-Nassan, Fujita et al. 2012). Ezzel ellentétben a nagy intenzitású mozgás megnöveli a gyulladáskeltő tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) és az interleukin-1 β (IL-1 β) szintjét is (Scott, Sale et al. 2013). Az IL-6

negatívan és pozitívan is befolyásolhatja a gyulladásos állapotot: ha a T sejtekből és makrofágokból szabadul fel, akkor gyulladásos választ stimulál, míg a működő vázizmok által termelt IL-6 anti-inflammatorikus tulajdonságú, mivel gátolja a TNF- α és az IL-1 β , illetve serkenti az IL-1ra és az IL-10 felszabadulását (Golbidi, Badran et al.).

A gyulladásos markerek – CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6 – tartósan emelkedett szintje a kismértékű szisztémás gyulladásos állapot rizikótényezője, illetve számos krónikus betegség velejárója, mint a II-es típusú cukorbetegség, egyes daganattípusok, kardiovaszkuláris megbetegedések, metabolikus szindróma (Mathur and Pedersen 2008, Wang, Yatsuya et al. 2013).

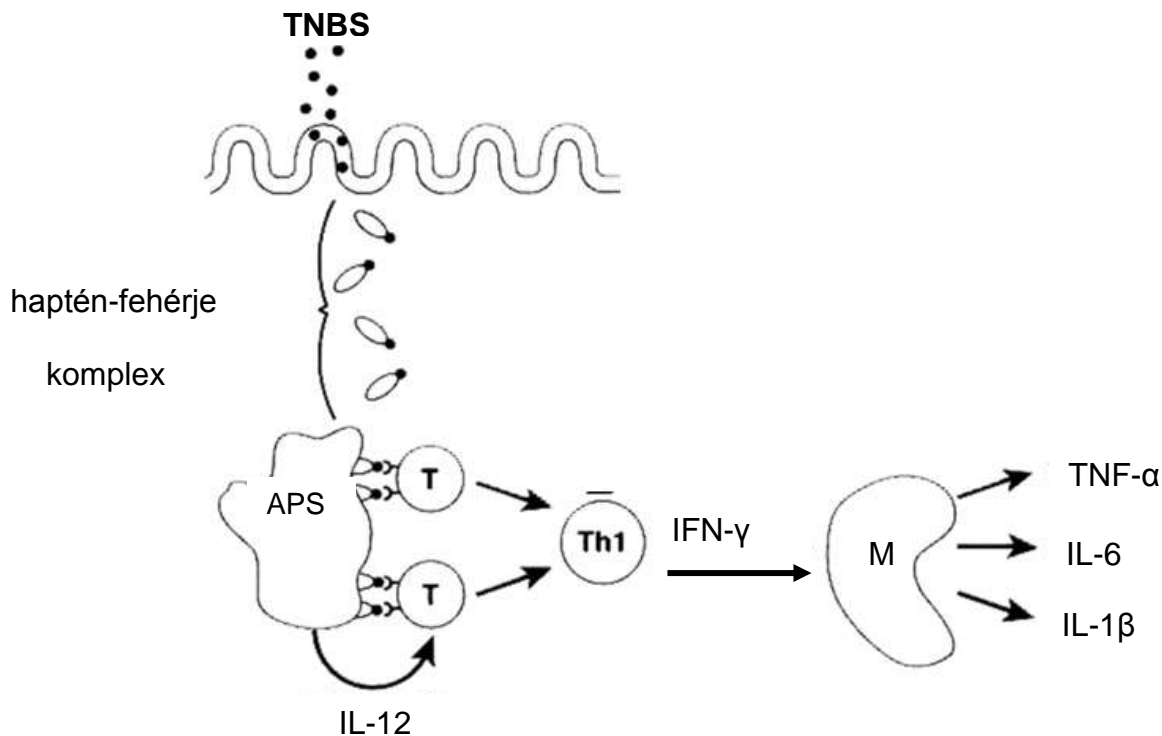
1.6. Gyulladásos jelmolekulák a bélrendszerben

A gyomor-bélrendszerben a táplálék és a bélbaktériumok anyagcseretermékei antigénként aktiválják az immunrendszert. Ennek hatására a bélnyálkahártya immunsejtjei, a neutrofil leukociták, a makrofágok, a dendritikus sejtek, a limfociták és a bélhámsejtek gyulladáscsökkentő és gyulladásokeltő citokinek szekretálásával válaszolnak (Paul, Khare et al. 2012). Az egészséges bélben a fő anti-inflammatorikus citokin az IL-10, a gyulladásos állapotot azáltal ellensúlyozza, hogy gátolja a gyulladásokeltő citokinek termelődését (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001, Huibregtse, van Lent et al. 2007). Az IL-10 szerepét hangsúlyozza az a tény is, hogy az IL-10 génhiányos egerekben spontán kialakul a vastagbélgyulladás (Sellon, Tonkonogy et al. 1998), továbbá az IL-10 adására csökken a gyulladás súlyossága (Emami, Chokshi et al. 2012).

A pro- és az anti-inflammatorikus folyamatok egyensúlyának felborulásakor az immunvédekezésben szerepet játszó mononukleáris sejtek gyulladásokkeltő mediátorokat szabadítanak fel, többek között a TNF- α -t és az IL-1 β -t. Az aktivált IL-1 β fokozza a fagociták antimikrobiális funkcióját és előmozdítja az intracelluláris patogének elleni védelmet (Nunes and de Souza 2013). A gyulladásos kaszkádban a szöveti makrofágok és a hízósejtek neutrofil kemoattraktánsokat szabadítanak fel, mint például a neutrofilekre kemoattraktáns kemokin (C-X-C motívum) ligand-1-et, melyek hatására a neutrofil leukociták kilépnek az érrendszerből és a gyulladt területre vándorolnak (Arijs, De Hertogh et al. 2011, Khor, Gardet et al. 2011, Strober and Fuss 2011, De Filippo, Dudeck et al. 2013). A neutrofilek antimikrobiális aktivitásukat a fagocitákban található mieloperoxidáz enzim (MPO) révén fejtik ki. A MPO katalizálta reakcióban hidrogén-peroxid jelenlétében a kloridion hipoklórsavvá oxidálódik, ami reagál a bakteriális eredetű proteinekkel és citotoxikus klóraminok keletkeznek (Nauseef 2007, Klebanoff, Kettle et al. 2013).

A gyulladásos bélbetegségek (inflammatory bowel diseases - IBD) pathomechanizmusát is a gyulladásokkeltő mediátorok túlzott mértékű felszabadulása és a leukociták migrációja jellemzi, melyekhez hozzájárul a RONS fokozott képződése (Achitei, Ciobica et al. 2013). A IBD két fő típusa a Crohn betegség és a colitis ulcerosa (fekélyes vastagbélgyulladás). A betegségek pontos etiológiája még nincs feltárva, genetikai, környezeti, mikrobiális tényezők és kóros immunválaszok játszanak szerepet a betegségek kialakulásában (Zhang and Li 2014). A TNF- α központi szerepét a gyulladásos kaszkádban alátámasztja, hogy gátlószereit (pl. Infliximab) sikeresen alkalmazzák a IBD-ben szenvedő betegeknél a remisszió előidézésére és fenntartására (Thomson, Gupta et al. 2012, Guo, Lu et al. 2013, Pedersen, Coskun et al. 2014).

A 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsavval (TNBS) kiváltott vastagbélgyulladás modellt elsőként Morris és munkatársai írták le 1989-ben (Morris, Beck et al. 1989). Az eljárás során a TNBS-at 50%-os etanollal hígítják, s az oldatot közvetlenül a vastagbélbe juttatják altatásban. Az akut gyulladás a kezelést követő 2-3 napon belül tetőzik. Első lépésként a TNBS és oldószere, az etanol károsítja a bélnyálkahártya barriert, majd a TNBS, ami egy haptén vegyület, képes kötődni a bél saját fehérjéihez, s ezen haptén-fehérje komplexek az interleukin-12 és a T helper-1 közvetítette immunválaszt váltanak ki. Az aktivált makrofágok gyulladásokeltő mediátorokat – TNF- α , IL-6, IL-1 β - szabadítanak fel, ami a bélfal minden rétegét érintő gyulladásához vezet, s véres hasmenéssel és fogyással járó tüneteket okoz (Strober, Ludviksson et al. 1998, Kawada, Arihiro et al. 2007, Ishiguro, Ando et al. 2010) (1.ábra).



1. ábra: **TNBS hatásmechanizmusa a vastagbélben.** A bél saját fehérjéihez kapcsolódik a TNBS, s az így kialakuló haptén-fehérje komplex váltja ki a Th1 közvetítette immunválaszt (Strober, Ludviksson et al. 1998). APS = antigén prezentáló sejt, T = T sejt, Th1 = T helper 1 sejt, IFN- γ = interferon- γ , M = makrofág, IL-12 = interleukin-12; TNF- α = tumor nekrozis faktor- α ; IL-6 = interleukin-6; IL-1 β = interleukin-1 β

1.7. A hem-oxigenáz enzimrendszer

A hem-oxigenáz enzim (HO) katalizálja a prooxidáns hatású hem átalakulását biliverdinné, az továbbalakul bilirubinná, illetve keletkezik még szén-monoxid (CO) és vas, ami ferritinhez kötődik. Az antioxidáns bilirubin jelenlétét megtöbbszörözi egy körfolyamat: a biliverdint a biliverdin reduktáz alakítja át bilirubinná, majd hidrogén-peroxid képes visszaoxidálni biliverdinné (Jansen and Daiber 2012). A bilirubin az antioxidáns

tulajdonságát egyrészt a RONS direkt semlegesítésén, másrészt indirekt úton a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidáz (NADPH oxidáz) és protein kináz aktivitásának, a neutrofilek adhéziójának gátlásán, illetve a gyulladásos útvonalak módosításán keresztül fejt ki (Abraham and Kappas 2008). A gáz halmazállapotú CO fő forrása a HO katalizálta reakció, másrészt főképp stressz hatására HO-független útvonalakon, szerves molekulák, fenolok és flavonoidok oxidációjával, illetve lipidek peroxidációjával is keletkezhet. A CO a ciklikus guanozin-monofoszfáton (cGMP) keresztül vagy a cGMP-független útvonalon, kalcium (Ca^{2+})-függő kálium csatorna aktiválásán keresztül vazodilatációt okoz. Továbbá gyulladáscsökkentő hatással is bír, mivel gátolja a gyulladáskeltő citokineket ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, makrofág inhibítor protein- 1β) (Abraham and Kappas 2008).

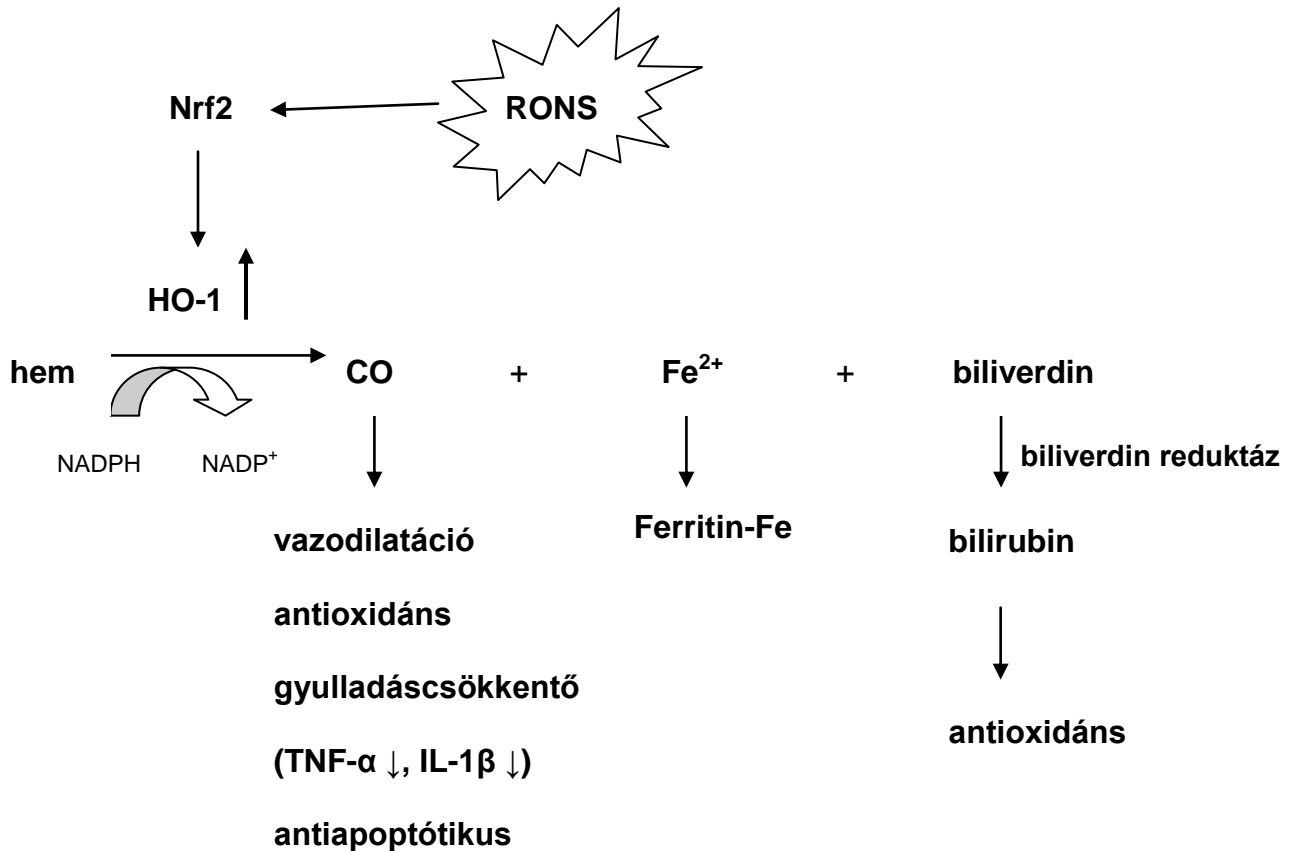
A HO-nek három izoformája ismert: az indukálható hem-oxigenáz-1 (HO-1) és a konstitutívan expresszáldó hem-oxigenáz-2 (HO-2) és hem-oxigenáz-3 (HO-3) (Zhu, Fan et al. 2011). A 32 kDa-os HO-1 és a 36 kDa-os HO-2 két különböző gén termékei, melyek kb 42% hasonlóságot mutatnak az aminosav-szekvenciájukban. Az újonnan felfedezett HO-3 izoformáról keveset tudunk, egy 33 kDa protein, aminosav-szerkezetében 90%-os homológiát mutat a HO-2-vel (McCoubrey, Huang et al. 1997), feltehetően a HO-2 transzkriptjéből származó pszeudogén (Hayashi, Omata et al. 2004).

Fiziológias körülmények között a HO-1 lépben és májban expresszáldik nagy mennyiségben, ahol a vörösvértestek szétesésével felszabaduló hem bontását végzi. A HO-1 sejten belül több sejtalkotóban előfordulhat, az endoplazmatikus retikulumban, a kaveolákban és a mitokondriumban egy hidrofób transzmembrán szegmens a citokróm P450 reduktázzal és a biliverdin reduktázzal együtt kihorgonyozza a membránhoz. Stressz

hatására a transzmembrán domén lehasításával a megrövidült enzim a citoplazmába vagy a sejtmagba kerül (Dunn, Midwinter et al. 2014). A HO-1 izoforma transzkripcióját, melyet hősokk protein 32-nek is neveznek, számos tényező képes indukálni: pl. nehézfémek, RONS, hipoxia, hősokk (Tsiftoglou, Tsamadou et al. 2006). A IBD-ben szenvedő betegeken és állatkísérletes modelleken végzett vizsgálatok igazolják, hogy a gyulladt bélben megemelkedik a HO-1 expressziója (Barton, Rampton et al. 2003, Paul, Bataille et al. 2005, Takagi, Naito et al. 2008), indukciója pedig gyulladáscsökkentő hatással bír. A HO-1 enzim aktivitásának és expressziójának fokozásán keresztül is kifejti protektív hatását az 5-amino-szalicilsav, a IBD-ben szenvedő betegek kezelésére széles körben alkalmazott aminoszalicilátok hatóanyaga (Horvath, Varga et al. 2008). Továbbá például a HO aktivitást serkentő hemin (Varga, Laszlo et al. 2007) és a hipertermia (Kokura, Yoshida et al. 2007) csökkenti, míg a HO-1 aktivitását gátló cink-protoporfirin IX és ón-protoporfirin IX (SnPP) súlyosbítja a kísérletes bélgyulladást patkányban (Varga, Laszlo et al. 2007, Zhong, Xia et al. 2010).

A fizikai aktivitás időtartamától és intenzitásától függően képes befolyásolni a HO-1 expresszióját és aktivitását. Míg a rövid ideig tartó mozgás nem növeli a HO-1 expresszióját, addig a félmaraton, maraton szignifikáns mértékben megemeli a fehérvérsejtekben a HO-1 expresszióját (Fehrenbach, Niess et al. 2003, Thompson, Basu-Modak et al. 2005, Marfe, Tafani et al. 2010). Atlétákban figyelték meg, hogy a HO-1 expressziója nyugalmi állapotban represszált, ami a rendszeres fizikai aktivitáshoz való adaptálódásra utal (Niess, Passek et al. 1999). A mozgás HO-1 aktivitását fokozó hatását a keletkező RONS is közvetítik NF-E2 kapcsolt faktor 2-n (Nrf2) keresztül (Golbidi, Badran et al.) (2. ábra). Nrf2 egy transzkripció faktor, ami a sejtet ért oxidatív stressz hatására a

citoplazmából a sejtmagba kerül, ahol transzkripciós faktorokkal kapcsolódik össze. A keletkezett heterodimer képes kötődni számos antioxidáns védekezésben szerepet játszó molekula – többek között HO-1 – génjének promoter régiójában levő antioxidáns válasz elem szekvenciához és ez által fokozza a célgénjének átírását (Bataille and Manautou 2012).



2. ábra: **A RONS hatása a HO-1 expressziójára.** A hem bomlásából származó CO és bilirubin is részt vesz az oxidatív stressz leküzdésében (Golbidi, Badran et al.). RONS = reaktív oxigén és nitrogén származékok, Nrf2 = Nf-E2 kapcsolt faktor 2, HO-1 = hem-oxigenáz-1, CO = szén-monoxid, Fe²⁺ = szabad vas, NADPH = redukált nikotinamid adenin dinukleotid foszfát, NADP⁺ = oxidált nikotinamid adenin dinukleotid foszfát, TNF-α = tumor nekrozis faktor-α, IL-1β = interleukin-1β

A konstitutívan expresszáldó HO-2-t számos szervben kimutatták, nagy mennyiségben megtalálható az agyban: a neuronokban, a gliasejtekben és az agyi erekben (Parfenova and Leffler 2008, Leffler, Parfenova et al. 2011). Továbbá leírták még testisben, placentában, uterusban, a bélidegrendszerben, cornea epitél sejtekben és a keringési rendszerben (Kreiser, Kelly et al. 2003, Shotton and Lincoln 2006, Piotrkowski, Monzon et al. 2009, Bellner, Patil et al. 2011, Bagyanszki and Bodi 2012). Expresszióját a kortikoszteroidok befolyásolják transzkripció szinten, illetve hipoxia vagy hipotenzio hatására a HO-2 aktivitását a protein foszforilációs poszttranszlációs mechanizmusok dinamikusan szabályozzák (Kim, Pae et al. 2011, Leffler, Parfenova et al. 2011). Hisztokémiai tanulmányok bizonyítják, hogy a HO-2 jelen van a glomus caroticumban, ahol feltehetően az általa katalizált reakcióban keletkező CO a glomus caroticum szenzoros érzékenységét szabályozza, illetve a Ca^{2+} -aktivált kálium csatornák aktiválásán keresztül vazodilatációt okoz (Leffler, Parfenova et al. 2011, Prabhakar 2012). A gyomor-bélrendszerben a körkörös simaizmokban pedig a transzmembrán potenciál gradiens kialakításában van szerepe a HO-2 működése során az idegi elemekből felszabaduló CO-nak (Sha, Farrugia et al. 2010). Irodalmi adatok alapján a HO-1 és a HO-2 is szerepet játszik a gyulladás leküzdésében és a sebgyógyulásban (Seta, Bellner et al. 2006).

1.8. A nitrogénmonoxid-szintáz enzimrendszer

Az oxidatív stresszben és gyulladásos folyamatokban szintén fontos szerepet tölt be a nitrogénmonoxid-szintáz enzimrendszer (NOS). Ezek az enzimek L-arginin L-citrullinná alakulását katalizálják, a reakció során nitrogénmonoxid (NO) keletkezik. Mivel a

lipidoldékony NO egy rövid életidejű molekula (féléletideje az élő szervezetben 10-30 sec), így a felszabadulásának közvetlen környezetében hat (600 μm távolságra képes eldiffundálni) (Knowles and Moncada 1992). A NO sokféle szignalizációs utat elindíthat, melyek alapvetően két kiindulási lépésből ágaznak tovább: egyrészt a NO stimulálja a guanilát cikláz, ami guanozin-trifoszfátból (GTP) a cGMP keletkezését katalizálja, másrészt fehérjéket S-nitrozilál, vagyis a fehérjék ciszteinjéhez vagy tirozinjához kovalensen kapcsolódik (Umar and van der Laarse 2010). A konstitutívan expresszáldó NOS (cNOS) izoformák a neuronális NOS (nNOS vagy NOS1) és az endoteliális NOS (eNOS vagy NOS3), Ca^{2+} -függőek, mivel autoinhibitoros hélixük van, ami alacsony Ca^{2+} -koncentráció mellett destabilizálja kalmodulin kötődését az enzimhez (Balligand, Feron et al. 2009). A nNOS főként az idegi elemekben lokalizálódik, azonban megtalálható izomsejtekben, epitel sejtekben, hízósejtekben, neutrophil granulocitákban. Az eNOS-t, ahogy a neve is mutatja, először endotel sejtekben azonosították, azóta bebizonyosodott, hogy számos más sejtben is előfordulhat, mint például epitel sejtekben, idegi elemekben, simaizom sejtekben, vérlemezkékben, T-sejtekben és hízósejtekben (Forstermann, Boissel et al. 1998, Haverkamp and Eldred 1998, Gilchrist, McCauley et al. 2004, Zhou and Zhu 2009). A harmadik izoforma az indukálható NOS (iNOS vagy NOS2) Ca^{2+} -független, szinte valamennyi sejttypusban megtalálható, szabályozása transzlációs és poszttranszlációs szinten is megvalósul, aktivitását például gyulladások keltő faktorok - $\text{TNF-}\alpha$, interferon- γ - illetve egyes baktériumok képesek fokozni (Dijkstra, Yuvaraj et al. 2007, Pautz, Art et al. 2010, Rafa, Amri et al. 2010, Thurston, Larmonier et al. 2010).

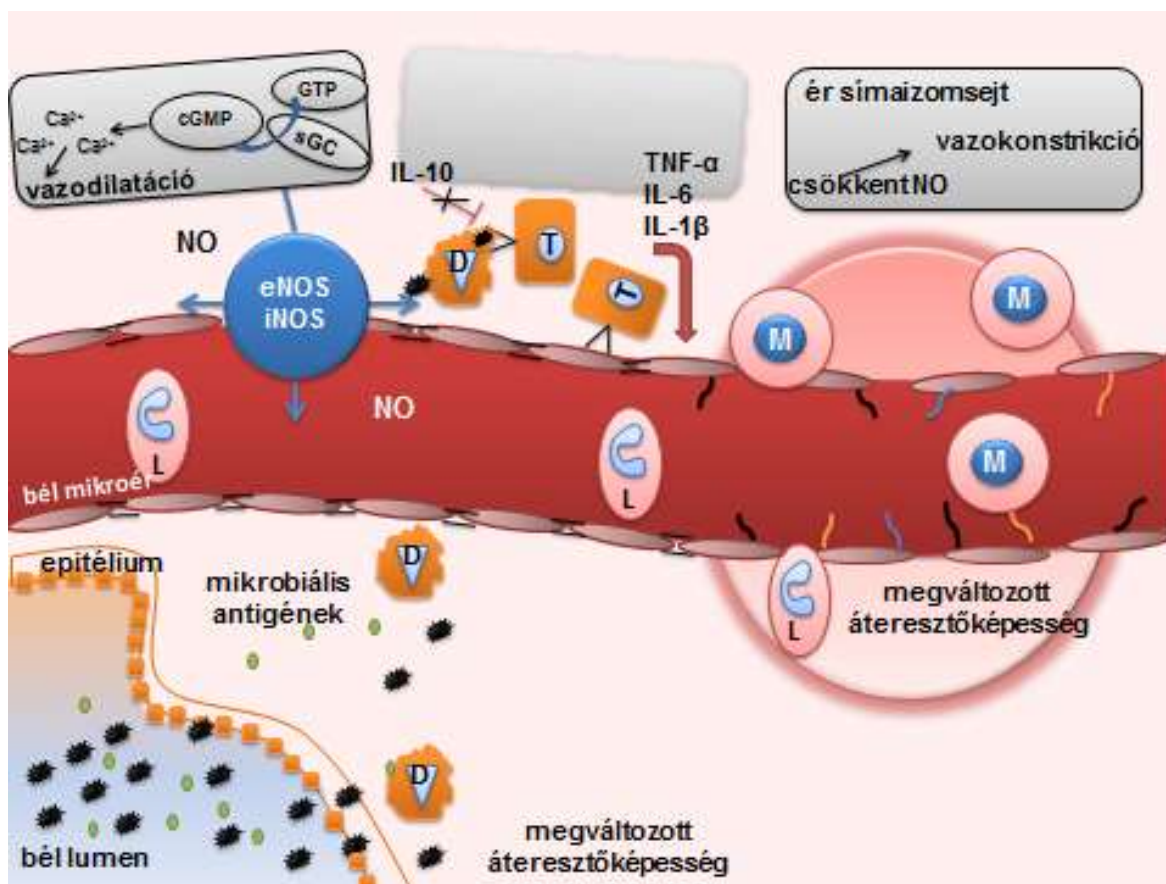
Az eNOS és a nNOS katalizálta reakcióban kis mennyiségben keletkezik NO, ezzel ellentétben az iNOS nagyobb mennyiségű NO-t termel (Kolios, Valatas et al. 2004). A

NOS által termelt NO jótékony és károsító is lehet, attól függően hogy hol és mekkora mennyiségben keletkezik. A kis mennyiségben keletkező NO a cGMP-on keresztül, a vazodilatáció biztosítása révén a keringés finomhangolásában is részt vesz (Derbyshire and Marletta 2012). Az érendotél sejtekben expresszáldó eNOS szintjét többek között a fokozódó nyíróerő, a mozgás és az oxigénhiányos állapotok képesek növelni (Chatterjee, Black et al. 2008). A NO egy reaktív molekula, amely oxigén szabadgyökökkel is képes reakcióba lépni, ekkor citotoxikus dinitrogén-trioxid és peroxinitrit keletkezik, melyek reakcióba léphetnek a DNS-sel, a fehérjékkel és a lipidekkel, ezáltal nagy mennyiségben további oxidatív károsodásokat okoznak (Pacher, Beckman et al. 2007). Az iNOS és az általa nagy mennyiségben termelt NO számos betegség patológiás folyamatában szerepet játszik a keletkező peroxinitrit révén: szív- és érrendszeri megbetegedések, krónikus gyulladással járó állapotok, daganatok, cukorbetegség (Pacher, Beckman et al. 2007).

1.8.1. NOS izoformák a béltraktusban

A béltraktusban mindhárom NOS izoforma megtalálható mind a kapillárisok endotéljében, a bélidegrendszer neuronjaiban és a bélfal izomzatában, azonban eloszlásuk, funkciójuk és aktivitásuk eltérő mértékben változik a fiziológiás és patológiás folyamatokban (Vannucchi, Corsani et al. 2002, Vallance, Dijkstra et al. 2004, Van Geldre, Fraeyman et al. 2004, Talapka, Bodi et al. 2011, Baccari, Traini et al. 2012). Eddigi ismereteink alapján a konstitutív izoformáknak a bélrendszer fiziológiás állapotának fenntartásában betöltött szerepük, hogy szabályozzák az epitél réteg permeabilitását. A mikrovaszkuláris tónus szabályozásában a nNOS által termelt NO is részt vesz, azáltal hogy bazális vazomotor tónust és véráramlást tart fenn, míg az eNOS katalizálta

reakcióból származó NO a véráramlás dinamikus változásait biztosítja (Seddon, Chowienczyk et al. 2008, Shabeeh, Seddon et al. 2013). A bélidegrendszer nitrerg neuronjaiból felszabaduló NO a simaizomsejtek relaxációján keresztül a bélperisztaltika leszálló ágának szabályozója (Hata, Ishii et al. 1990, Bartho and Lefebvre 1995). Az iNOS fehérje expressziója az egészséges bélben is kimutatható, hiszen a bélrendszer folyamatosan érintkezik baktériumokkal. Ugyanakkor csupán kis mennyiségben van jelen, főként a nyálkahártya lamina propria rétegében levő neutrophil granulocitákban és az epitel sejtekben (McCafferty, Miampamba et al. 1999). Az erek endotéljében az eNOS mellett az iNOS is jelen lehet. Ezek az enzimek által termelt NO gyulladáscsökkentő hatást fejt ki, ugyanis gátolja a leukociták kitapadását az endotélhez, értágító hatású és szabályozza az endotél permeabilitását. Paradox módon a leukocitákban található iNOS a gyulladásos reakciókhoz járul hozzá, míg az endotél sejtekben lévő NOS feltehetően gyulladáscsökkentő (Cromer, Mathis et al. 2011, Danese 2011) (3.ábra).



3. ábra: **A megváltozott endotél funkció a gyulladt bélben.** A gyulladásos válaszban lecsökken az endotél sejtekből származó NO produkció (Cromer, Mathis et al. 2011). D = dendritikus sejt, T = T sejt, L = leukocita, M = makrofág, TNF- α = tumor nekrosis faktor- α , IL-1 β = interleukin-1 β , IL-6 = interleukin-6, IL-10 = interleukin-10; cGMP = ciklikus guanozin-monofoszfát; sGC = szolubilis guanilát cikláz; GTP = guanozin-trifoszfát, NO = nitrogénmonoxid, eNOS = endoteliális nitrogénmonoxid-szintáz, iNOS = indukálható nitrogénmonoxid-szintáz

A különböző izoformák termelte NO szerepének vizsgálatát a béltraktus gyulladásos megbetegedéseiben számos kutatás tűzte ki céljául. Az eredmények abban megegyeznek, hogy míg az egészséges bélben az iNOS kis mennyiségben detektálható, addig a béltraktus gyulladásos állapotaiban emelkedett iNOS expresszió mutatható ki a colon

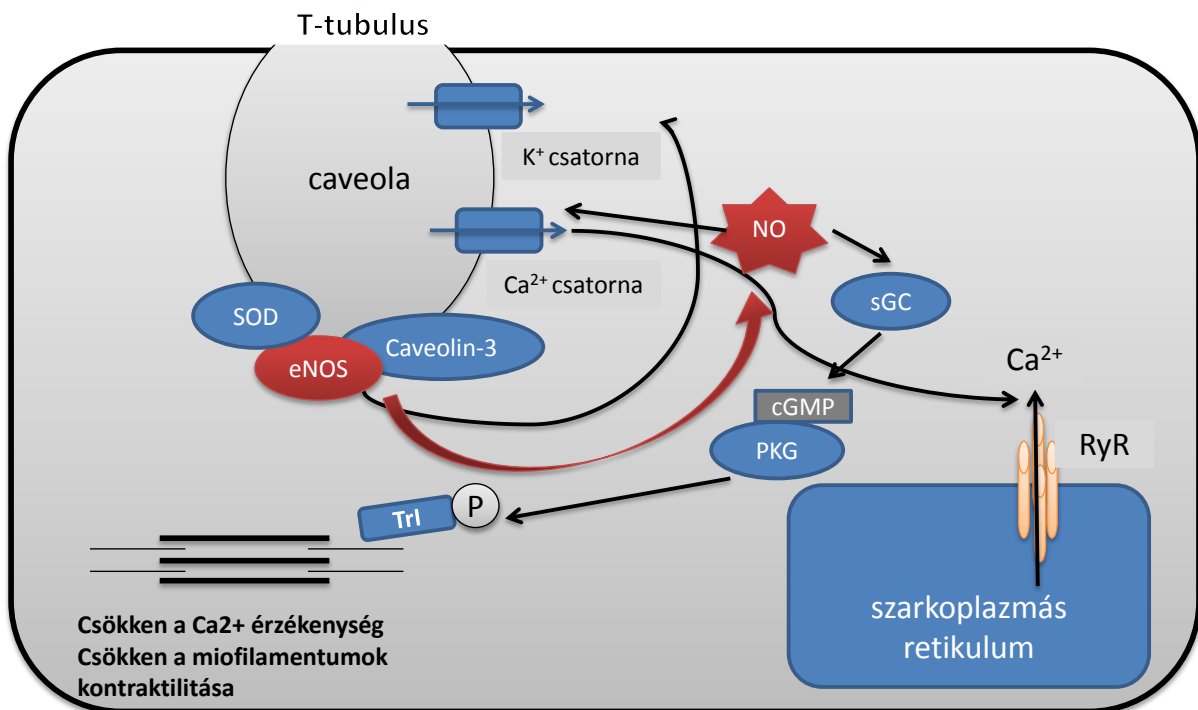
gyulladt régiókban az epítél sejtekben és a lamina propria mononukleáris sejtjeiben, s ez okozhatja a fokozott NO termelést (Ancha, Kurella et al. 2009, Gonzalez-Mauraza, Martin-Cordero et al. 2014). Porras és mtsai. kísérletes vékonybélgyulladásban kimutatták, hogy az iNOS mRNS expressziója ciklikusan a betegség aktív fázisában emelkedett, míg a nNOS mRNS-e downregulált a gyulladt vékonybélben (Porras, Martin et al. 2006). Beck és mtsai. dextrán szodium szulfát indukálta vastagbélgyulladásban nem mértek szignifikáns változást a nNOS mRNS-ének expressziójában, ugyanakkor a gyulladt területeken a nNOS fehérje nagyobb mennyiségben volt detektálható (Beck, Xavier et al. 2004). Kísérletes vastagbélgyulladásban az eNOS fehérje mennyisége jelentősen megnő az endotél sejtekben (Beck, Xavier et al. 2004, Vallance, Dijkstra et al. 2004). Azért, hogy jobban megértsük, hogy az egyes izoformák milyen szerepet játszanak a gyulladás folyamatában, génmódosított egereken végeztek kísérleteket. Azonban az eredmények ellentmondásosak, Beck és mtsai. kísérleteiben az eNOS és az iNOS is protektívnek bizonyult, míg a nNOS génkiütött állatokban súlyosabb bélgyulladást kaptak (Beck, Xavier et al. 2004). Több kutatócsoport pedig épp az ellenkezőjéről számol be, az eNOS illetve az iNOS génmódosított egerekben egyaránt súlyosabb gyulladást tapasztaltak a vad típushoz képest (McCafferty, Miampamba et al. 1999, Sasaki, Bharwani et al. 2003, Vallance, Dijkstra et al. 2004). Így az egyes izoformáknak a bélgyulladás pathomechanizmusában betöltött pontos szerepének tisztázása további kísérleteket igényel.

1.8.2. NOS izoformák a kardiovaszkuláris rendszerben

A szív- és érrendszerben fiziológias körülmények között az eNOS az endotél sejtekben, illetve kisebb mennyiségben a szívizomsejtekben, a nNOS az intracardialis idegi elemekben expresszálódik, míg az iNOS egészséges szívben nincs jelen, gyulladásos és stressz faktorok azonban indukálják az expresszióját (Umar and van der Laarse 2010).

Szívben az eNOS-t termelő több endotél réteget különböztetünk meg: az endocardium és a miocardium kapillárisainak cardialis endotél rétegét, illetve az epicardiumban lévő nagyobb koronáriák és a miocardiumban futó kisebb koronáriák érendotél sejtjeit (Brutsaert 2003). eNOS aktivitásának és a bioaktív NO szintnek a szövetspecifikus, dinamikus szabályozása transzlációs, poszttranszlációs és epigenetikus szinten is megvalósul (Dudzinski and Michel 2007). Az eNOS inaktív állapotban a keringési rendszer és a szív ereinek endotél sejteiben caveolin-1-en keresztül plazmamembrán vezikulákhoz, caveolákhoz kihorgonyozva található (Feron and Kelly 2001, Miethke, Feussner et al. 2003). A vér áramlásának következtében az érfalra ható nyíróerő képes fokozni az eNOS aktivitását. Gyors válaszként az eNOS disszociál a caveolákhoz rögzítő negatív regulátoráról, és kalcium-kalmodulinnal asszociálva aktiválódik (Rizzo, McIntosh et al. 1998, Duran, Breslin et al. 2010). Majd a NO szint további fenntartásához a NF- κ B-n keresztül az eNOS mRNS transzkripciója és stabilitása is nő. A keletkező NO a CO-hoz hasonlóan, a szolubilis guanilát ciklázon (sGC) és a cGMP-n útvonalon keresztül is vazodilatációt okoz (Balligand, Feron et al. 2009). Az eNOS a miokardiumban a szarkolemma és a T-tubulusok caveoláihoz a caveolin-3-on keresztül kapcsolódik (Feron, Belhassen et al. 1996, Umar and van der Laarse 2010) (4. ábra). Az eNOS aktivitását fokozhatja a szívizomsejtek nyújtása (Petroff, Kim et al. 2001), agonista kötődése a β 3-

adrenoreceptorokhoz vagy a muszkarinos M2 receptorokhoz (Massion and Balligand 2003, Zhang and Casadei 2012). Az eNOS indukciójából fakadó hatás a keletkező NO mennyiségétől, a sejt oxidatív állapotától és a kiváltó stimulustól függően lehet pozitív vagy negatív inotróp hatás. A szívműködés relaxációját válthatja ki a következő útvonalakon keresztül. A felszabaduló nagyobb mennyiségű NO a cGMP-n keresztül aktiválja a protein kináz G-t (PKG), ami foszforilálja a troponin I-t, a foszforilált troponin I pedig gátolja a troponin C-t, ezáltal csökken a miofilamentumok Ca^{2+} érzékenysége (Layland, Li et al. 2002). Pozitív inotróp hatást vált ki a kis koncentrációban jelen levő NO, ami S-nitrozilálja a T-tubulusok feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} csatornáit és a szarkoplazmás retikulum 2-es típusú rianodin receptorait (Massion and Balligand 2003, Umar and van der Laarse 2010) (4. ábra).



4. ábra: **eNOS szignalizációs útvonalak a szívizomsejtekben.** A szívizomsejtekben az eNOS katalizálta reakcióban keletkező NO cGMP függő és független útvonalakat is képes indukálni. Trl = troponin I, PKG = protein kináz G, sGC = szolubilis guanilát cikláz, RyR = rianodin receptor, cGMP = ciklikus guanozin-monofoszfát

Ábra forrása: http://docs.abcam.com/pdf/cancer/nitric_oxide_signaling.pdf nyomán

A nNOS, a másik konstitutív izoforma, a szívizomsejtekben a szarkoplazmás retikulumban található, nagyon közel a rianodin receptorokhoz és a xantin oxidoreduktázhoz. Génmódosított egereken és a NOS inhibitorok alkalmazásával végzett kísérletek nem adnak egyértelmű választ a nNOS szerepére. Fiziológiai körülmények között szabályozza a szarkoplazmás retikulum Ca²⁺ leadását és visszavételét azáltal, hogy az eNOS-hoz hasonlóan S-nitrozilálja a 2-es típusú rianodin receptorokat (Danson, Choate et al. 2005). Roberto Saraiva és mtsai. egerekben igazolták, hogy ha a nNOS downregulált

volt, akkor a xantin oxidoreduktáz aktivitása fokozódott így a nNOS-nak szerepe lehet a miokardium redox állapotának beállításában is (Saraiva, Minhas et al. 2007).

A konstitutív formákkal ellentétben az iNOS expresszióját és aktivitását a gyulladásos mediátorok, mint például az IL-1 β , az interferon- γ (Balligand, Ungureanu-Longrois et al. 1994, Pautz, Art et al. 2010), stressz faktorok mint a hipoxiás állapot, vagy a szepszis képesek fokozni (Jung, Palmer et al. 2000).

1.8.3. A fizikai aktivitás hatása a NOS izoformákra a kardiovaszkuláris rendszerben

A fizikai aktivitás számos útvonalon keresztül hatással van az ereket bélelő endotél sejtekre. Egyrészt hemodinamikai, mechanikai hatást fejt ki az erekre: emeli a pulzusszámot, ami növeli a véráramlást, az érfalra ható nyíróerőt és nyújtja az érfalat. Másrészt kémiai jelemolekulákat szabadít fel, citokineket, izom-eredetű metabolitokat, idegi-humorális faktorokat (Whyte and Laughlin 2010). A mozgásra válaszként néhány másodpercen belül megnő az eNOS aktivitása, vazodilatációt kiváltva, aminek következtében a nyíróerő mértéke normalizálódhat. A különböző intenzitású mozgások eltérően befolyásolják a NO termelését és bioaktivitását, míg a közepes intenzitású fizikai aktivitás során nő a NO mennyisége, addig a megerőltető mozgás következtében felszabaduló ROS reagálnak a NO-dal, így lecsökkentik annak mennyiségét (5. ábra).

RONS-at termelő enzim, az általa termelt reaktív gyökök a NO-dal reagálhatnak, csökkentve a NO szintet és növelve a nagyon reaktív peroxinitrit mennyiségét (Rodino-Janeiro, Paradela-Dobarro et al. 2013). A mozgásról bebizonyosodott, hogy képes csökkenteni a NADPH oxidáz aktivitását, ugyanakkor növeli a RONS semlegesítéséért felelős enzimek, a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és a glutathion peroxidáz aktivitását (Leung, Yung et al. 2008). E mechanizmusok által is növeli a NO szintet és javítja az endotél funkciót (Di Francescomarino, Sciartilli et al. 2009). A mozgással ellentétben a magas vérnyomásra jellemző oszcilláló nyíróerő prooxidáns hatású (Majzunova, Dvinova et al. 2013). Az eNOS által termelt NO-nak nagy szerepe van abban, hogy a szív a rendszeres mozgáshoz „hozzáedződjön”. Egyrészt fokozza a miokardium kontrakciós erejét, másrészt a kardiovaszkuláris rendszer regenerációját is segíti azáltal, hogy fokozza a szívben és az érben a progenitor sejtek mobilizációját, migrációját és differenciálódását (Ellison, Waring et al. 2012).

2. Célkitűzések

Korunk civilizációs betegsége a mozgásszegény életmód. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a szabadidős testmozgás milyen hatással van a szív- és érrendszere és az akut, kísérletes vastagbélgyulladásra patkányban.

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestük a választ.

1. Célul tűztük ki az antioxidáns HO enzim szerepének igazolását aortagyűrű-modellben.
2. Van-e nemek közötti különbség az aortagyűrű kontrakciós válaszában a HO aktivitás gátlását követően?
3. A 6 hetes szabadidős testmozgás hogyan befolyásolja a HO aktivitást aortában és szív bal kamrában?
4. A 6 hetes szabadidős testmozgás hogyan befolyásolja a cNOS aktivitást aortában és szív bal kamrában?
5. A 6 hetes futás során, illetve a TNBS kezelést követően hogyan változik az állatok testtömege?

6. Milyen hatással van az előzetesen 3, 6 és 10 héten át végzett futókerekes mozgás a TNBS kiváltotta akut colitis súlyosságára és kiterjedésére?

7. A 6 hetes szabadidős mozgás indukálta folyamatok következtében vagy akut gyulladásban, továbbá a kettő kombinációjakor hogyan változik a HO aktivitás patkány vastagbélben?

8. A 6 hetes szabadidős mozgás indukálta folyamatok következtében vagy akut gyulladásban és a kettő kombinációjakor hogyan változik a cNOS és az iNOS aktivitás patkány vastagbélben?

3. Anyagok és módszerek

3.1. Patkány aortagyűrű kontrakció kísérletek

3.1.1. Felhasznált állatok

Kísérleteinkhez hím és nőstény Wistar patkányokat (230-250 g) használtunk. HO gátlószereként SnPP-t alkalmaztunk 24 és 1 órával az aortagyűrű kontrakció vizsgálata előtt (SnPP; Frontier Scientific Europe; 30 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., pH 7,4). A nőstényeken a proösztroz fázisban hajtottuk végre a kísérleteket. A kísérleteket a Szegedi Tudományegyetem által elfogadott Állatkísérletes Etikai Kódex előírásai szerint végeztük.

3.1.2. Nőstény patkányok ivari ciklusának meghatározása Giemsa festéssel

A reprodukív életkorban lévő nőstény állatok ivari ciklusának meghatározásához fiziológiás sóoldattal átitatott vattával hüvelyváladékot vettünk, tárgylemezre kenetet készítettünk. A kenetet láng fölött fixáltuk, Giemsa oldattal (metilénazúr-eozin) megfestettük, és fénymikroszkópban vizsgáltuk. A metilénazúr a fehérvérsejtek és a hámsejtek magjait kékre, az eozin a hámsejtek citoplazmáját rózsaszínre festi. A patkányok ivari ciklusának négy fázisa (proösztroz, ösztroz, metösztroz és diösztroz) a hüvelykenetben található sejttípusok (sejtmaggal rendelkező laphámsejtek; elszarusodott, sejtmag-nélküli laphámsejtek; fehérvérsejtek) eltérő arányaival jellemezhető. A proösztroz fázisban, amikor az ösztradiol szint eléri maximumát, a sejtmaggal rendelkező laphámsejtek dominálnak.

3.1.3. Patkány aortagyűrű-kontrakció ex vivo vizsgálata

Cervikális diszlokációt követően az állatok hasi aortáját kipreparáltuk, Krebs-Henseleit bikarbonát oldatba ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $95,0\%\text{ O}_2$ / $5,0\%\text{ CO}_2$) (118 mM NaCl ; 25 mM NaHCO_3 ; $1,18\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$; $4,7\text{ mM KCl}$; $1,18\text{ mM MgSO}_4$; $2,5\text{ mM CaCl}_2$; $5,5\text{ mM}$ glükóz; $\text{pH } 7,4$) (Stallone 1993) helyeztük, majd a zsír- és kötőszöveti elemek eltávolítása után az aorta hasi szakaszából 3 mm gyűrűt kivágtunk, tömegét lemértük és két rozsdamentes acélhorogra tettük. Minden állatból két szomszédos aorta-szakaszon végeztük párhuzamosan a méréseket. Az alsó horog egy rögzített rozsdamentes acélrúdhhoz csatlakozott, a felső pedig egy transzducerrel állt összeköttetésben az izometriás nyomás mérése céljából. Az aortafeszülés folyamatos mérése érdekében az érzékelőkar ISOSYS számítógépes programhoz (Experimetria, London, Egyesült Királyság) volt csatlakoztatva. A felhelyezést követően a gyűrűket azonnal $15,0\text{ ml } 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os, $95,0\%\text{ O}_2$ – $5,0\%\text{ CO}_2$ -dal dúsított inkubációs oldatot tartalmazó szervedényben inkubáltuk $20\text{--}30$ percig, $2,5\text{ g}$ passzív nyomáson, majd $2,0\text{ }\mu\text{g/ml}$ arginin-vazopresszint (AVP, Organon, Hollandia) adtunk az inkubációs elegyhez. Az AVP-re adott kontrakciós választ az aortagyűrű nyomásával fejeztük ki (g/mg aortagyűrű).

3.2. Szabadidős testmozgás kísérletek – kardiovaszkuláris rendszer vizsgálata

3.2.1. Felhasznált állatok

Kísérleteinket 200-250 g kezdeti testtömegű hím Wistar patkányokon végeztük. Az állatokat standard körülmények között tartottuk (világítás, páratartalom, hőmérséklet), csapvizet ad libitum kaptak, standard granulált patkánytápot fogyasztottak. A kísérleteket a Szegedi Tudományegyetem által elfogadott Állatkísérletes Etikai Kódex előírásai szerint végeztük.

3.2.2. Szabadidős testmozgás modellezése

A szabadidős mozgás kísérleteknél a nem-futó csoportokba tartozó állatokat négyesével, hagyományos ketrecekben, a futó csoport állatait kettesével, futókerékkel felszerelt ketrecekben (ACELLABOR Kft., Budapest) tartottuk. A 6 hetes futást követően az állatok szív bal kamráját és hasi aortáját eltávolítottuk, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, az aortát dörzsmozsárban elporítottuk. A mintákat a biokémiai mérésekig - 20 °C-on tároltuk. A mintákból a következő méréseket végeztük el: HO és NOS enzimek aktivitásának és fehérjetartalmának meghatározása.

3.3 Szabadidős testmozgás kísérletek – vastagbélgyulladás vizsgálata

3.3.1. Felhasznált állatok

Kísérleteinket 200-250 g kezdeti testtömegű hím Wistar patkányokon végeztük. Az állatokat standard körülmények között tartottuk (világítás, páratartalom, hőmérséklet), csapvizet ad libitum kaptak, standard granulált patkánytápot fogyasztottak, a TNBS kezelést megelőzően 12 órán át megvontuk tőlük a táplálékot. A kísérleteket a Szegedi Tudományegyetem által elfogadott Állatkísérletes Etikai Kódex előírásai szerint végeztük.

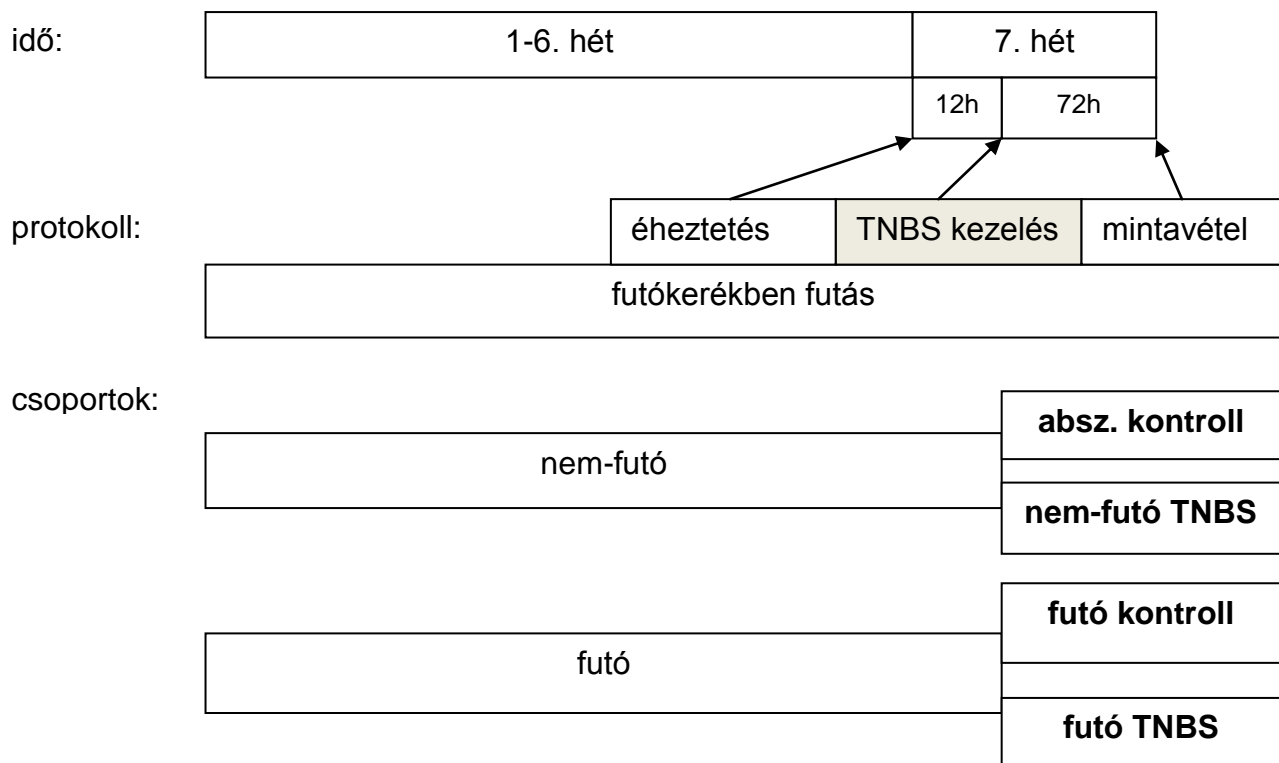
3.3.2. Kísérletek menete

A szabadidős mozgás kísérleteknél a nem-futó csoportokba tartozó állatokat négyesével, hagyományos ketrecekben, a szabadidős mozgást végző állatokat kettesével, futókerékkel felszerelt ketrecekben (ACELLABOR Kft., Budapest) tartottuk. A futás ideje alatt hetente mértük az állatok testtömegét, illetve a futó csoportoknál a lefutott távolságot a futókerékre szerelt kilométer óráról olvastuk le.

A 3, 6 illetve 10 hét elteltével a nem-futó és a futó állatokat két-két csoportra osztottuk, így a következő négy csoportot kaptuk (6. ábra: 6 hetes futás protokollon bemutatva):

- abszolút kontroll (nem-futó, nem kapott TNBS-at)
- nem-futó TNBS (nem-futó, futási idő végén kapott TNBS-at)
- futó kontroll (futó, nem kapott TNBS-at)
- futó TNBS (futó, a futási idő végén kapott TNBS-at)

A TNBS kezelést követően a futó csoport állatait továbbra is a futókerékkel felszerelt ketrecekben tartottuk. Mintavétel során eltávolítottuk az állatok vastagbelének végbéltől számított 8 cm-es szakaszát, hosszában felnyitottuk a mesenterium mentén, fiziológias sóoldattal átmostuk, kifeszítettük, lefotóztuk (Panasonic lumix DMC-TZ6, digitális fényképezőgép) a további makroszkópikus planimetriás analízishez. A mintákat a biokémiai mérésekig -20 °C-on tároltuk. A mintákból a következő méréseket végeztük el: MPO, HO és NOS enzimek aktivitásának és fehérjetartalmának meghatározása.



6. ábra: **Kísérletek menete.** A 6 hetes szabadidős testmozgást követő TNBS kezelés.

TNBS = 2,4,6-trinitrobenzén-szulfonsav

3.3.3. Vastagbélgyulladás kiváltása

A vastagbélgyulladást helyileg adott 0,25 ml 50%-os etanolban hígított TNBS-val (10mg) váltottuk ki. (a TNBS kezelés metodikáját elsőként Morris és mtsai. írták le (Morris, Beck et al. 1989)). A TNBS kezelést megelőző 12 órán át az összes állattól megvontuk a táplálékot. A nem-futó és a futó állatok egy-egy csoportját intracolónálisan TNBS-val kezeltük egy 8 cm-es polietilén kanül segítségével dietil-éteres altatásban. A TNBS oldatot a kezelés napján frissen készítettük. Az állatok testtömegét naponta mértük. A mintavétel a kezelést követően 72 órával történt.

3.3.4. Nyálkahártya-gyulladás makroszkópikus paramétereinek vizsgálata

A gyulladás, lézió kiterjedését planimetriás analízissel határoztuk meg. A bélszakaszokról készített képeken egy, a laborunk által fejlesztett számítógépes planimetriás program (Stat_2_1_1) segítségével lemértük a keletkezett gyulladások százalékos kiterjedését a 8 cm-es bélszakaszhoz viszonyítva.

A gyulladások súlyosságát a fotók alapján egy 11 pontos skála segítségével értékeltük (a skálát Boughton-Smith és mtsai. írták le (Boughton-Smith, Wallace et al. 1988)):

0: nincs változás

1: helyi vérbőség, nincs fekély

2: fekély, vérbőség és falvastagodás nélkül

3: fekély és gyulladás egy helyen

4: fekély és gyulladás két vagy több helyen

5: legalább 1 cm-en keresztül fekély és gyulladás

- 6: legalább 2 cm-en keresztben fekély és gyulladás
- 7: legalább 3 cm-en keresztben fekély és gyulladás
- 8: legalább 4 cm-en keresztben fekély és gyulladás
- 9: legalább 5 cm-en keresztben fekély és gyulladás
- 10: legalább 6 cm-en keresztben fekély és gyulladás
- 11: legalább 7 cm-en keresztben fekély és gyulladás

A mérések kivitelezését „vakon” végeztük.

3.4. Enzimaktivitások mérése

3.4.1. MPO aktivitásmérés

Különböző gyulladásos folyamatok jellemzésére használják a MPO mérést (Bradley, Priebat et al. 1982). Ez az enzim a neutrofil granulocitákban található, amely fehérvérsejtek a gyulladásos folyamatban a vérből a gyulladt területre lépnek ki. Így a MPO enzim mennyisége jól jellemzi a gyulladás mértékét. A minták homogenizálását 0,5% hexadeciltrimetilammónium–bromidot tartalmazó foszfát pufferben (50 mM, pH 6,0) jégen végeztük. Ennek során a feldarabolt vastagbelet 2 ml hideg foszfát pufferben, Ultra-turrax homogenizáló (Ultra-turrax T25 IKA-Labortechnik) segítségével (2x30 sec, 13000 rpm) homogenizáltuk. A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd 37 °C-on vízfürdőben felolvasztottuk. A fenti folyamatot háromszor megismételtük. Ezt követően mintáinkat centrifugáltuk (10000 g, 15 min, 4 °C), a mérésekhez a felülúszót használtuk. A MPO méréseinkhez peroxidázt használtunk standardként (0; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 U/ml). A mérés során 96-lyukú Elisa plate-be tettünk 280 µl O-dianizidin-

dihidrokloridot (0,167 mg/ml foszfát puffer). Ehhez adtunk a felülúszónkból vagy a standardunkból 12 µl-t és a reakciót 10 µl 0,03%-os hidrogén-peroxiddal indítottuk. 90 másodperces rázatás után 490 nm-en Elisa reader (Benchmark Microplate reader, Bio-Rad Labs) segítségével mértük a kialakult színváltozásokat. Eredményeinket mU/ mg fehérjére vonatkoztattuk.

3.4.2. HO aktivitásmérés

A HO aktivitásának mérésénél Tenhunen módszerén változtatva a hem átalakulása során keletkező bilirubin szintet mértük spektrofotometriás módszerrel (Tenhunen, Marver et al. 1968). A minták homogenizálását (Ultra-turrax T25, 2x30 sec, 13 000/sec) 2 ml pufferben (10 mM N-[2-hidroxietil] piperazin-N'-[2-etánszulfonsav], 32 mM szacharóz, 0,1 mM EDTA, 10 µg/ml tripszin inhibitor, 10 µg leupeptin, 10 µg aprotinin, 1 mM dithiothreitol; pH 7,4) végeztük 4 °C-on. Ezt követően a mintákat lecentrifugáltuk (30 min, 20000 g, 4 °C), majd a felülúszóval dolgoztunk. A reakció során 1,5 ml végtérfogatú inkubáló oldatot használtunk: 100 mM KH_2PO_4 , 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 µg tripszin inhibitor, 10 µg leupeptin 10 µg aprotinin, 0,1 mM DTT; 2 mM glükóz-6-foszfát, 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, 120 µg/ml biliverdin-reduktáz (patkánymáj citoszol), 15 µM hem, 150 µM β -nikotinamid adenin dinukleotid foszfát (β -NADPH) pH 7,4. A mérésnél 75 µl minta felülúszót adtunk az 1,5 ml inkubáló oldathoz, a reakciót 50 µl β -NADPH-tal (150 µM) indítottuk, 1 órán keresztül 37 °C-os vízfürdőben sötétben inkubáltuk, majd a mintákat jégre téve állítottuk le a reakciót. A méréshez bilirubin oldatot használtunk standardként (58,47 µg/ml, 10 µM). A vak mintákat (β -NADPH-mentes reakció elegy) azonnal lemértük.

A mérések 460 és 530 nm-en történtek. A HO összaktivitás értékeket a β -NADPH-os és vak minták optikai denzitásának egységnyi fehérjetartalomra vonatkoztatott különbsége adta (nM bilirubin/óra/mg fehérje).

3.4.3. NOS aktivitásmérés

NOS aktivitásméréssel a [^{14}C]-jelölt L-arginin L-citrullinná alakult mennyiségét határoztuk meg Boughton-Smith módszerét néhány módosítással alkalmazva (Boughton-Smith, Evans et al. 1993). A mintákat a HO aktivitásmérésnél leírt módon homogenizáltuk, majd a mérésekhez a felülúszót használtuk. 10 percig 37 °C-on inkubáltuk a mintákat (40 μl) a következő 100 μl végtérfogatú puffer oldatban: 50 mM KH_2PO_4 , 1,0 mM MgCl_2 , 50 mM L-valin, 0,2 mM CaCl_2 , 1,0 mM dithiothreitol, 1,0 mM L-citrullin, 15,5 nM L-arginin, 30 μM flavin adenin dinukleotid, 30 μM flavin mononukleotid, 30 μM tetrahidro-L-biopterin dihidroklorid, 450 μM β -NADPH, 12 pM [^{14}C]-L-arginin-monohidroklorid. A reakciót jégen tartott 0,5 ml DOWEX-szel (Na^+ forma, 1/1 (v/v) desztillált vízben oldva) állítottuk le, majd 850 μl jégen tartott desztillált vizet adtunk hozzá. Az így kapott elegy felülúszójából vett 970 μl -ben mértük a radioaktivitást jelző beütésszámot. Kalciumkötőként etilén glikol-bis (β -aminoetil éter) tetraecetsavat (EGTA, 10 μl , 1 mM), NOS inhibítorként N ω -nitro-L-arginin-metilésztert (LNNA, 10 μl , 3,7 mM) adtunk a puffer oldathoz. A fiziológias sóoldatot tartalmazó pufferoldatos elegyben mértük a legnagyobb [^{14}C]-jelölt L-citrullin mennyiséget (iNOS, cNOS és nem specifikus kötődés), a NOS inhibítort tartalmazó pufferoldatos mintáknál a [^{14}C]-jelölt L-citrullin mennyiséget a nem specifikus kötődés adta, míg a kalciumkötő EGTA-at tartalmazó minták esetében az iNOS (Ca^{2+} független NOS izoforma)

és a nem specifikus kötődés eredményezte a mért [^{14}C]-jelölt L-citrullin mennyiséget. Az iNOS aktivitást az EGTA-at és a NOS inhibítort tartalmazó minták [^{14}C]-jelölt L-citrullin mennyiségének különbségéből kaptuk egységnyi fehérjére vonatkoztatva (pmol/ perc/ mg fehérje). A cNOS aktivitást a fiziológias sóoldatot és az EGTA-t tartalmazó minták [^{14}C]-jelölt L-citrullin mennyiségének különbségéből kaptuk egységnyi fehérjére vonatkoztatva (pmol/ perc/ mg fehérje).

3.4.4. Fehérjetartalom mérése Bradford mikromódszerrel

A fehérjemérésnél (Bradford 1976) a standard sorunkhoz (0-10 $\mu\text{g/ml}$) bovine serum albumint használtunk. Mintáinkból a szükséges hígítás (25x vagy 50x) után 20 μl -t tettünk 980 μl desztillált vízhez, ezután mind a standard sorhoz, mind pedig a mintáinkhoz 200 μl Bradford reagenst adtunk. 10 perc inkubáció után 595 nm-en mértük az optikai denzitást. Eredményeinket mg fehérje/ ml koncentrációban adtuk meg.

3.5. Statisztikai analízis

Eredményeink értékelése során a kétmintás student „ t ” tesztet alkalmaztuk. Az eredményeket $P < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

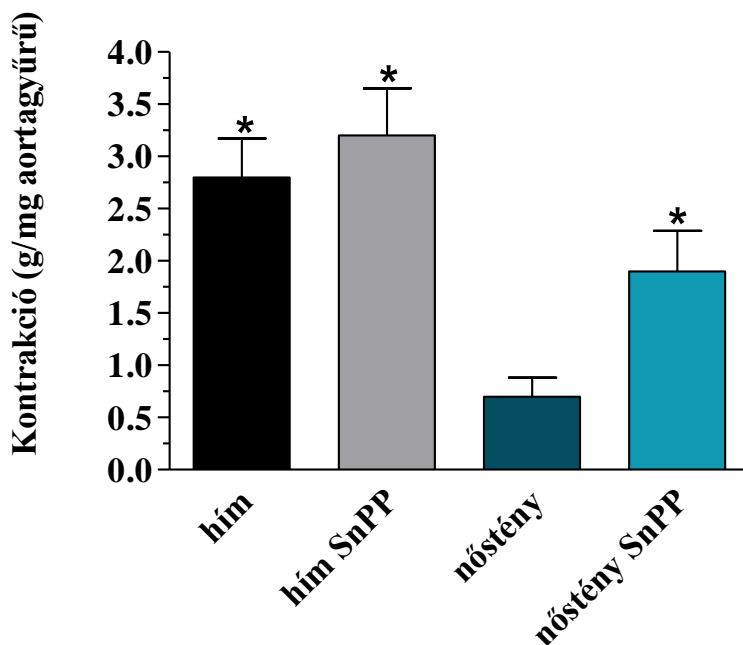
3.6. Felhasznált anyagok

A szövegben külön meg nem jelölt vegyszereket a Sigma-Aldrich (USA) forgalmazta.

4. Eredmények

4.1. HO rendszer szerepe az érendotélium vazodilatációjában

Ex vivo aortagyűrű kontrakciós kísérletekben már korábban igazoltuk, hogy hím patkányokban szignifikánsan magasabb az AVP-re (2,0 µg/ml) adott kontrakciós válasz (Pósa 2008). Az SnPP (30 µmol/kg) előkezelést alkalmazva (24 és 1 órával a mérés előtt) azt tapasztaltuk, hogy hímeknél és nőstényeknél is megemelkedett az AVP-re adott válasz a nem kezelt azonos nemű csoporthoz viszonyítva, továbbá a HO aktivitásának gátlása megszüntette a nemek közti különbséget (7. ábra).

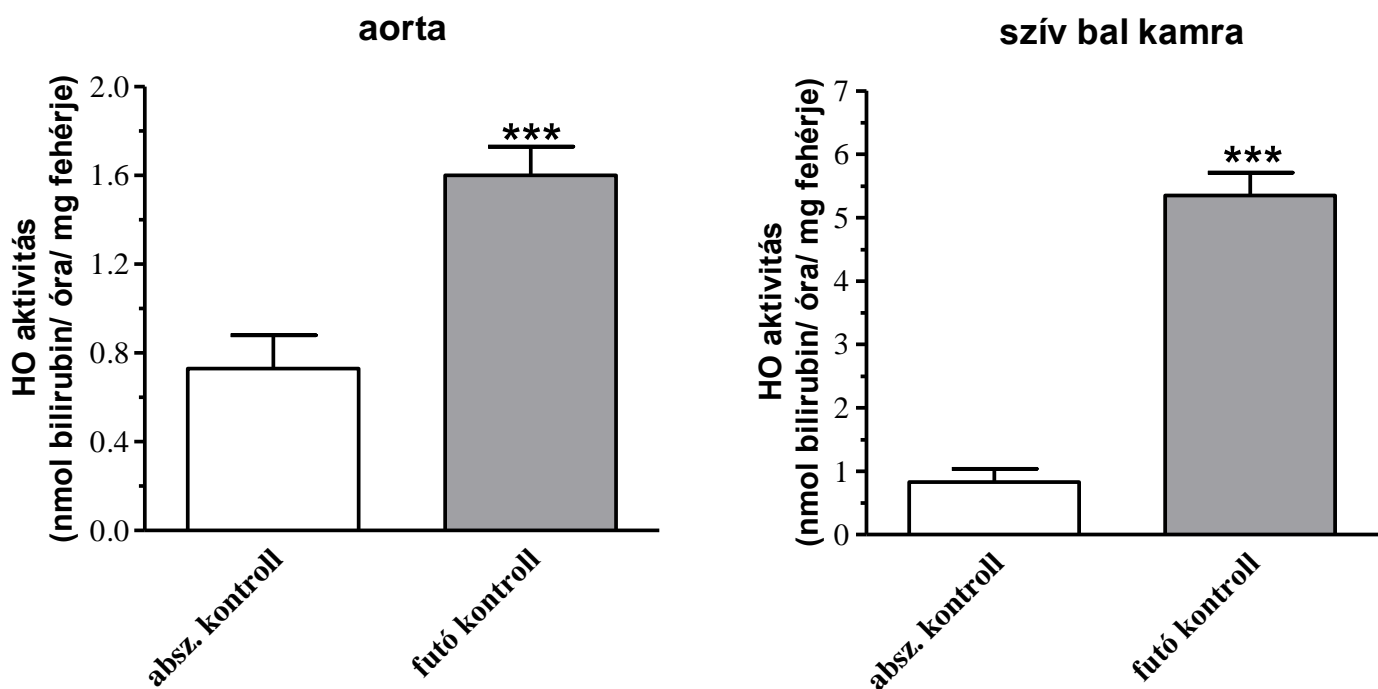


7. ábra: Hasi aortagyűrű kontrakciójának változása a HO aktivitást gátló SnPP adását követően. A HO gátlása megszünteti a nemek közti különbséget. Átlag ± S.E.M.; n=9-11;

* $P < 0,05$ a kezeletlen nőstény csoporthoz viszonyítva.

4.2. A HO aktivitásának változása 6 hetes szabadidős testmozgás hatására aortában és szív bal kamrában

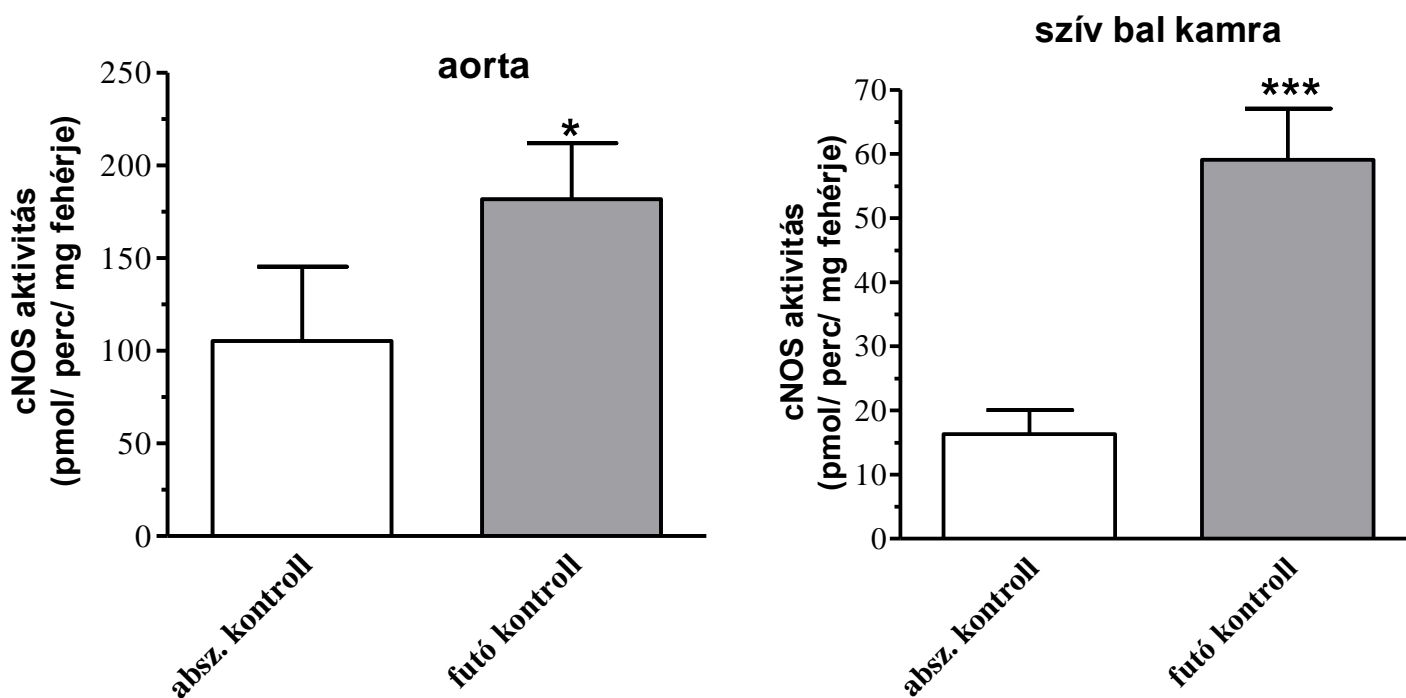
A 6 héten át tartó szabadidős testmozgás szignifikánsan megnövelte az antioxidáns HO aktivitását a hasi aortában ($0,73 \pm 0,15$ nM bilirubin/ óra/ mg fehérjéről $1,6 \pm 0,13$ nM bilirubin/ óra/ mg fehérjére) és a miocardiumban ($0,83 \pm 0,21$ nM bilirubin/ óra/ mg fehérjéről $5,35 \pm 0,36$ nM bilirubin/ óra/ mg fehérjére). Az eredményeket a 8. ábrán mutatom be.



8. ábra: Szabadidős testmozgás hatása a HO aktivitására aortában és szív bal kamrában. A 6 hetes futás fokozta a HO aktivitását a vizsgált szervekben. Átlag \pm S.E.M.; $n=12-15$; *** $P<0,001$ az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva.

4.3. A cNOS aktivitásának változása 6 hetes szabadidős testmozgás hatására aortában és szív bal kamrában

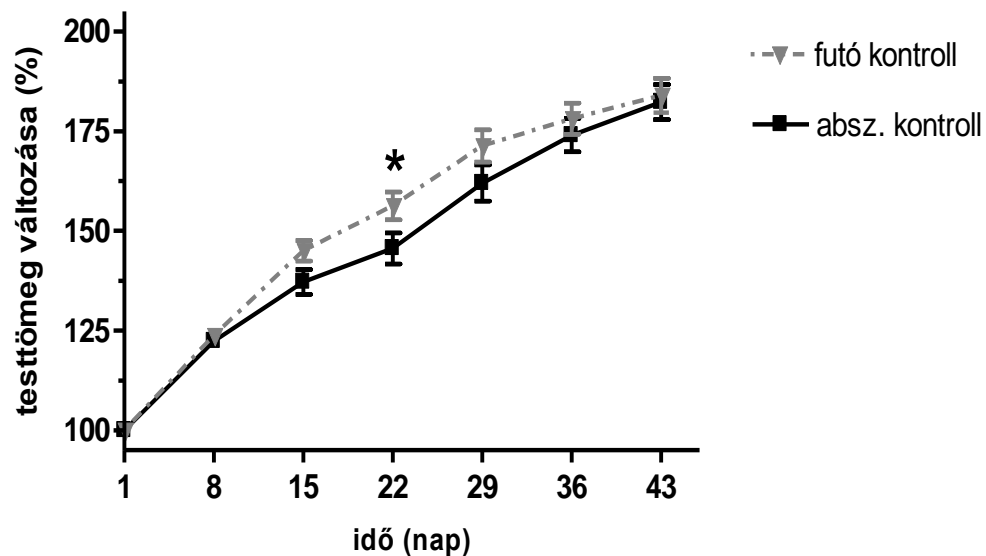
A hat héten keresztül végzett szabadidős testmozgás szignifikánsan megemelte a cNOS aktivitását aortában ($105,38 \pm 40$ pmol/ perc/ mg fehérjéről $181,78 \pm 30,29$ pmol/ perc/ mg fehérjére) és szív bal kamrában ($16,32 \pm 3,71$ pmol/ perc/ mg fehérjéről $59,11 \pm 7,94$ pmol/ perc/ mg fehérjére). Az eredményeket a 9. ábrán mutatom be.



9. ábra: **Szabadidős testmozgás hatása a cNOS aktivitására hasi aortában és szív bal kamrában.** A 6 hétig tartó mérsékelt intenzitású mozgás szignifikánsan megemelte a cNOS aktivitását a vizsgált szervekben. Átlag \pm S.E.M.; $n=8-15$; * $P<0,05$; *** $P<0,001$ az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva.

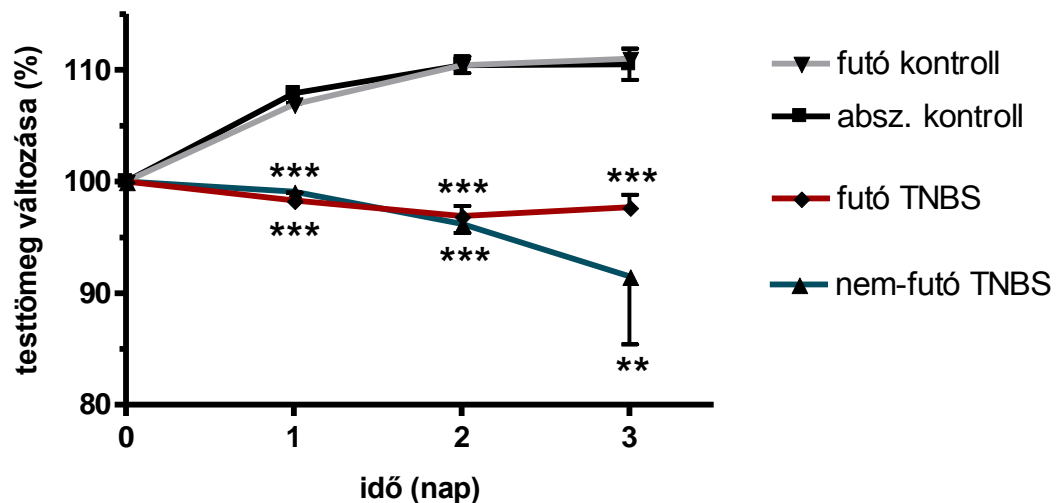
4.4. Az állatok testtömegének változása futás és TNBS kezelés hatására

A kerekre szerelt kilométerórák segítségével mértük az állatok által megtett távolságot, átlagosan 2600 métert futott egy patkány egy nap alatt. A 6 hét alatt a rendszeres mozgást végző állatok testtömege nagyobb ütemben emelkedett, de szignifikáns különbség csak a harmadik hét végén volt megfigyelhető a nem-futó állatokhoz viszonyítva, a hatodik hét végére azonban a futó és nem futó állatok testtömege között nem volt különbség (10. ábra).



10. ábra: **Az állatok testtömegének százalékos változása a 6 hetes futás alatt az első naphoz viszonyítva.** A nem-futó és futó állatok testtömege a 6 hét alatt eltérő módon emelkedett, de a hatodik hét végére közel azonos súlyokat mértünk a két csoportnál. 100%-nak a kiindulási testtömeget tekintettük. Átlag \pm S.E.M.; $n=34-53$; $*P<0,05$ az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva.

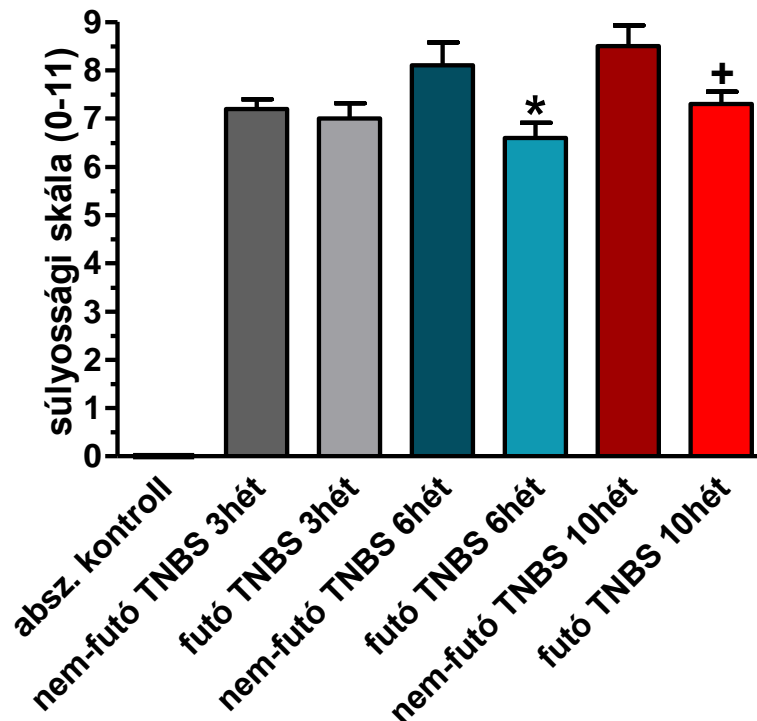
A TNBS kezelést követően az állatok testtömeg-változását naponta monitoroztuk. A TNBS kezelést kapott állatok fogyni kezdtek, ám a futó TNBS kezelt csoportban a harmadik nap nem csökkent tovább a patkányok testtömege (11. ábra).



11. ábra: **A TNBS kezelés hatása a testtömeg változására 6 hetes futást követően.** A TNBS kezelt csoportokba tartozó állatok tömege szignifikánsan csökkent, ám a futó csoportokban ez a testtömeg-csökkenés a második napon megállt. 100%-nak a TNBS kezelés napján mért testtömeget tekintettük. Átlag \pm S.E.M.; $n=11-38$; $**P<0,01$; $***P<0,001$ az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva

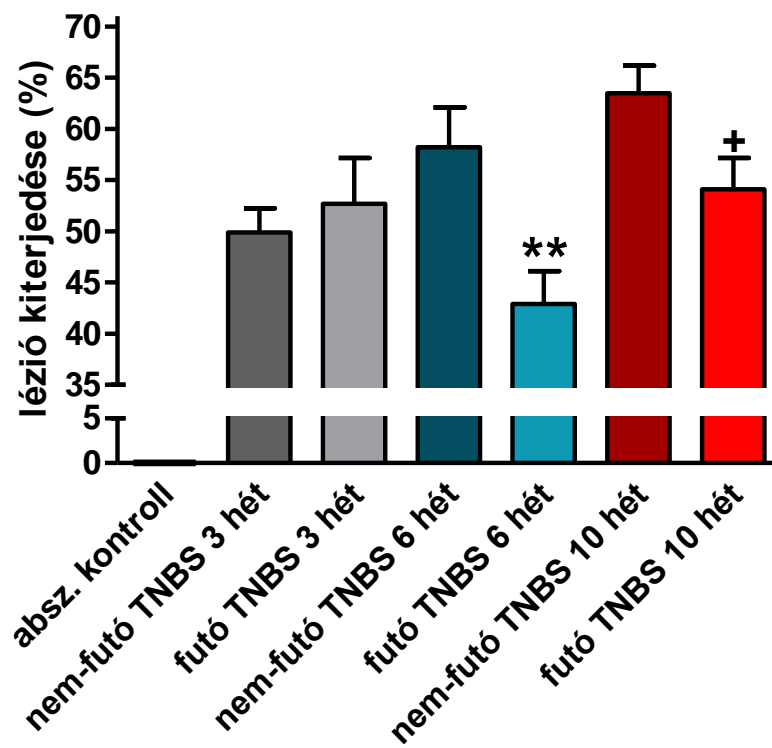
4.5. Makroszkópikus gyulladásos paraméterek a 3, 6 és 10 hetes futást követő TNBS kezelés hatására

A 3 hetes mozgás nem okozott változást sem a gyulladás százalékos kiterjedésében, sem súlyosságában. A 6 és 10 hétig tartó rendszeres mozgás szignifikánsan csökkentette a gyulladás súlyosságát (6 hetes futás esetén $8,1 \pm 0,5$ pontról $6,6 \pm 0,3$ pontra csökkent, 10 hetes futást követően $8,5 \pm 0,4$ pontról $7,3 \pm 0,3$ pontra csökkent). Eredményeinket a 12. ábrán mutatom be.



12. ábra: Az előzetesen 3, 6 illetve 10 héten át végzett szabadidős mozgás hatása a TNBS-val kiváltott vastagbélgyulladás súlyosságára. A 6 és a 10 hétig tartó mozgás szignifikánsan csökkentette a gyulladás súlyosságát. Átlag \pm S.E.M.; $n=5-18$; $^*P<0,05$ a 6 hetes nem-futó TNBS csoporthoz viszonyítva, $^+P<0,05$ a 10 hetes nem-futó TNBS csoporthoz viszonyítva.

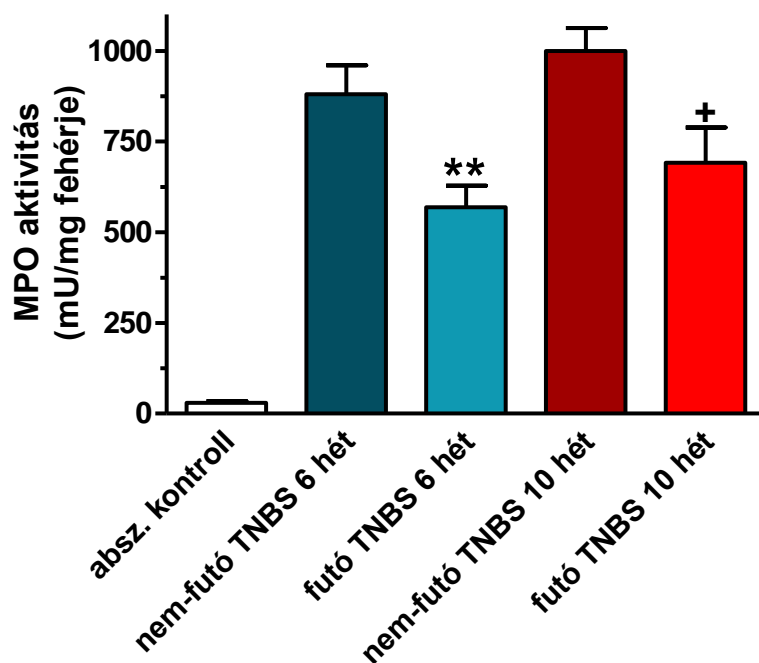
A 6 és 10 hétig tartó szabadidős mozgás szignifikánsan csökkentette a gyulladás kiterjedését (6 hetes futásnál $58,2 \pm 3,9$ %-ról $42,9 \pm 3,2$ %-ra csökkent, míg 10 hetesnél $63,5 \pm 2,7$ %-ról $54,1 \pm 3,1$ %-ra csökkent). Eredményeinket a 13. ábrán mutatom be.



13. ábra: A 3, 6 illetve 10 hetes futást követően TNBS-val kiváltott vastagbélgyulladás kiterjedése. A 6 és a 10 hétig tartó mozgás szignifikánsan csökkentette a gyulladás kiterjedését. Átlag \pm S.E.M.; $n=5-19$; ** $P<0,01$ a 6 hetes nem-futó TNBS csoporthoz viszonyítva, + $P<0,05$ a 10 hetes nem-futó TNBS csoporthoz viszonyítva.

4.6. A MPO aktivitásának változásai 6 és 10 hetes futást követő TNBS kezelés hatására

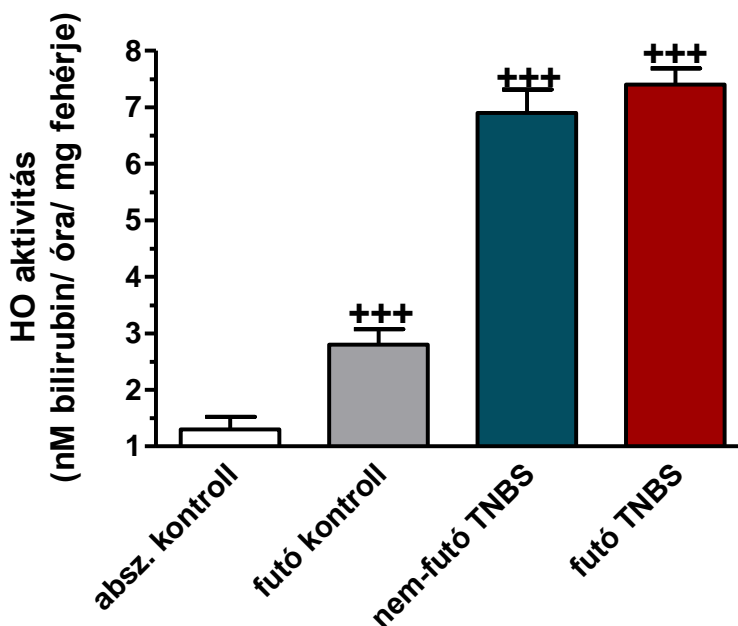
A 6 és a 10 héten keresztül rendszeresen futó, majd a tréning periódust követően TNBS kezelt állatoknál a MPO enzim aktivitása egyaránt csökkent a nem-futó csoporthoz viszonyítva: 6 hét futásnál $880,6 \pm 79,3$ mU/mg fehérje koncentrációról $568,4 \pm 59,9$ mU/mg fehérje koncentrációra csökkent, míg 10 hetes futásnál $999,8 \pm 63,0$ mU/mg fehérje koncentrációról $691,2 \pm 98,0$ mU/mg fehérje koncentrációra csökkent (14. ábra).



14. ábra: **A MPO enzim aktivitásának változása 6 illetve 10 hetes futást követő TNBS kezelés hatására.** Mind a 6 mind a 10 hetes futás szignifikánsan csökkentette a MPO enzim aktivitását a nem-futó állatokban mért értékekhez képest. Átlag \pm S.E.M.; $n=7-13$; $**P<0,01$ a 6 hetes nem-futó TNBS csoporthoz viszonyítva, $^+P<0,05$ a 10 hetes nem-futó TNBS csoporthoz viszonyítva.

4.7. A HO aktivitásának változása a TNBS kezelés és/vagy a 6 hét futás hatására patkány vastagbélben

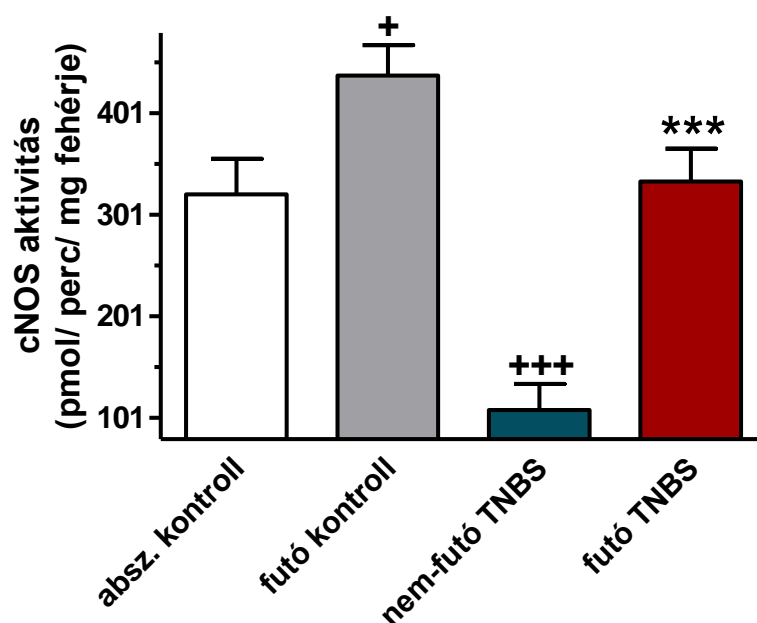
A 6 hétig tartó futás önmagában mintegy háromszorosára emelte a HO aktivitást az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva ($1,3 \pm 0,2$ nM bilirubin/ óra/ mg fehérje értékről $2,8 \pm 0,3$ nM bilirubin/ óra/ mg fehérje értékre). A kiváltott akut gyulladás tovább fokozta a HO aktivitás emelkedését az abszolút kontroll érték hétszeresére, ám a nem-futó és futó TNBS kezelt csoportok között nem volt különbség (nem futó TNBS csoportban $6,9 \pm 0,4$ nM bilirubin/ óra/ mg fehérje, futó TNBS csoportban $7,4 \pm 0,3$ nM bilirubin/ óra/ mg fehérje; 15. ábra).



15. ábra: **A HO enzim aktivitásának változása 6 hetes futást követően TNBS kezelés hatására.** A 6 hetes futás szignifikánsan megemelte a HO aktivitást, ami a gyulladás következtében tovább emelkedett, ám nem volt különbség a nem-futó és futó állatok gyulladt vastagbelének HO aktivitásában. Átlag \pm S.E.M.; $n=8-16$; $+++P<0,001$ az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva.

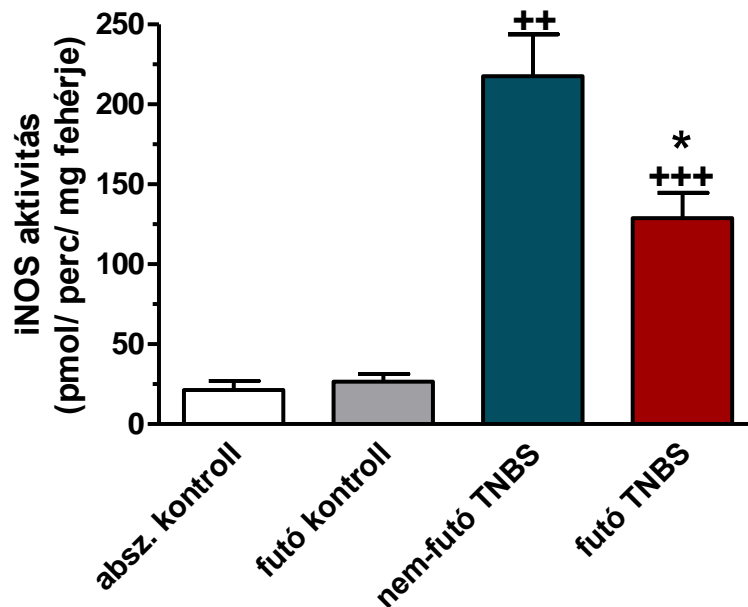
4.8. A cNOS és az iNOS aktivitásának változása a TNBS kezelés és/vagy a 6 hét futás hatására patkány vastagbélben

A cNOS aktivitását a futás szignifikánsan megemelte mind a futó kontroll, mind a futó TNBS csoportban a megfelelő nem-futó csoportokhoz viszonyítva. A mozgással ellentétben a gyulladt belekben jelentősen csökkent a cNOS aktivitás ($321,1 \pm 35,157$ pmol/ perc/ mg fehérjéről $108,9 \pm 25,6$ pmol/ perc/ mg fehérjére). Abban az esetben, ha a TNBS kezelést megelőző 6 hetes mozgás következtében magasabb értékről indult a csökkenés, akkor az abszolút kontroll állatokhoz hasonló cNOS aktivitás értéket kaptunk a futó TNBS csoportban ($333,9 \pm 32,3$ pmol/ perc/ mg fehérje; 16. ábra).



16. ábra: A cNOS aktivitásának változása vastagbél-gyulladásos állatokban hosszantartó szabadidős mozgást követően. A 6 hetes futás visszaállította a TNBS kezelés hatására szignifikánsan lecsökkent cNOS aktivitást. Átlag \pm S.E.M.; $n=6-14$; $^+P<0,05$ $^{+++}P<0,001$ az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva, $^{***}P<0,001$ a nem-futó TNBS csoporthoz viszonyítva.

Az iNOS aktivitása a TNBS kezelt állatok vastagbelében szignifikánsan megnőtt az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva. A mozgás pozitív hatása ezen enzim esetén is megmutatkozott, mivel mérsékelte az iNOS aktivitásának nagyfokú emelkedését a gyulladt belekben ($217,5 \pm 26,4$ -ről $128,9 \pm 15,8$ pmol/ min/ mg fehérje értékre csökkent; 17. ábra).



17. ábra: Az iNOS aktivitásának változása 6 hetes mozgást követően TNBS kiváltotta vastagbél-gyulladásos állatokban. A 6 hetes rendszeres mozgás kivédte a TNBS okozta iNOS aktivitás-emelkedést. Átlag \pm S.E.M.; $n=6-15$; $^{++}P<0,01$; $^{+++}P<0,001$ az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva; $^{*}P<0,05$ a nem-futó TNBS csoporthoz viszonyítva.

5. Megbeszélés

A szabadidős testmozgás protektív, megelőző szerepét számos krónikus betegségben leírták, többek között szív- és érrendszeri megbetegedésekben (Dhaliwal, Welborn et al. 2013), vastagbél-daganatnál (Thune and Furberg 2001), azonban a rekreációs mozgás által befolyásolt folyamatok egyes részletei, összefüggései még tisztázásra várnak mind a kardiovaszkuláris, mind pedig a gyomor-bélrendszerben.

Aortagyűrű-kontrakció vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a HO rendszernek szerepe van az aorta vazodilatációjában, és a kontrakciós válaszban megfigyelt nőstények és hímek közötti nemi dimorfizmus kialakításában is részt vesz. Kontroll állatokat SnPP-nel kezeltünk 24 és 1 órával a mintavétel előtt, ekkor hasi aortagyűrű *ex vivo* vizsgálata során a nőstényeknél szignifikánsan nagyobb kontrakciós választ kaptunk AVP-re, míg hímeknél tendenciális jellegű volt a különbség (Posa, Kupai et al. 2013). Korábbi kísérletek igazolták az ösztrogén kardiovaszkuláris védő szerepét (Pósa 2008). Eredményeinket és a szakirodalmi adatokat figyelembe véve a hímek a veszélyeztetettebbek a kardiovaszkuláris rizikótényezőket tekintve, így a további vizsgálatainkat hím patkányokra korlátoztuk. Eredményeink összhangban állnak Meng-Wei Sung és mtsai. megállapításaival, akik kontroll és 6 hetes futópados edzést végző állatokon nézték az aortagyűrű acetilkolinra adott relaxációs válaszát, amit a mozgás fokozott. A kontroll állatokban a NOS inhibitor teljes mértékben, míg futó állatoknál csak részben gátolta az acetilkolinra adott dilatációs választ. Abban az esetben kaptak a futó csoportnál kontrollhoz hasonló kontrakciós választ, ha a HO és a NOS aktivitások gátlószerét egyszerre alkalmazták (Sun, Zhong et al. 2008). Vagyis a mozgás okozta vazodilatáció közvetítésében a HO enzimrendszer is részt vesz. A

további kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a 6 héten át tartó rendszeres futás hogyan befolyásolja a HO és a NOS enzimek aktivitását hasi aortában és szív bal kamrában.

A fizikai aktivitás hatásainak vizsgálatainál kedvelt állatok a rágcsálók, melyek természetes mozgásformája a futás és az úszás. A kísérletek két nagy típusát lehet elkülöníteni aszerint, hogy az állatok a vizsgálat vezetőjének jelenlétében kényszerítve vannak a mozgásra, edzés jellegű a fizikai aktivitásuk - tipikusan ilyen kísérletek a futópados és az úsztatásos protokollok –, vagy önszántukból mozognak általában a ketrecük részét képező futókerékben, ami megfeleltethető a szabadidős vagy rekreációs testmozgásnak. A két mozgásformát összehasonlító vizsgálatokból kiderült, hogy a kényszerből végzett mozgás oxidatív stresszt okoz a szervezetben, míg az önszántukból végzett fizikai aktivitás esetén az oxidatív stressz jelentősen kisebb mértékű és feltehetően jótékony hatású azáltal, hogy stimulálja az antioxidáns védőmechanizmusokat (Asami, Hirano et al. 1998, Melo, Lunz et al. 2009). Ez utóbbi mozgásformát választottuk, így állatainkat futókerékkel felszerelt ketrecekben tartottuk.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a mérsékelt intenzitású és mennyiségű, krónikus mozgás megemelte aortában és a miokardiumban a HO enzim génexpresszióját és fehérjetartalmát is (Marini, Lapalombella et al. 2007, Sun, Zhong et al. 2008), mellyel összhangban áll, hogy kísérleteinkben megemelkedett az enzim aktivitása. Feltehetően mozgás hatására megnő a HO termelte CO szint, ami hozzájárul a vérkeringés fokozásán keresztül a kardiovaszkuláris védelemhez, hiszen előzetesen igazolták, hogy mozgás hatására megnő egyéb, az antioxidáns válaszban szerepet játszó molekulák, mint a mangán-SOD, glutathion-peroxidáz, ciklooxygenáz-2 expressziója is (Marini, Lapalombella et al. 2007).

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogyan változik a 6 héten át végzett szabadidős testmozgás hatására a cNOS aktivitása a kardiovaszkuláris rendszerben. A NOS enzimrendszer a HO termelte CO mellett egy másik vazoaktív gáz, a NO keletkezéséért felelős enzim. Aortában hosszabb időn át végzett futópados edzés az össz eNOS fehérjemennyiségét megemelte (Sun, Zhong et al. 2008), de a foszforilált (szerin 1177), vagyis aktivált eNOS mennyiségét és a cNOS aktivitását nem befolyásolta (McAllister and Price 2010). Kísérleteinkben a futókerékben szabadon végzett 6 hetes mozgás szignifikáns cNOS aktivitás emelkedést okozott a hasi aortában. Ennek hátterében az állhat, hogy feltételezhetően a fizikai aktivitás hatására nő a hasi aortában a nyíróerő, ami növeli szerin / treonin protein kinázon (Akt) keresztül az eNOS foszforilációját, s ez a poszttranszlációs módosítás aktiválja az enzimet (Fleming, Fisslthaler et al. 2005, Zhang, Li et al. 2007).

Szívben feltehetően a mozgásprogram időtartama meghatározó a cNOS aktivitását tekintve, ugyanis egy héten át végzett futópados futás nem befolyásolta a NOS izoformák fehérjemennyiségét, sem a NOS aktivitását szív bal kamrában (Lunz, Capettini et al. 2011), azonban a 10 héten át tartó úszás megemelte az eNOS expresszióját (Zhang, Li et al. 2007). 8 hetes futópados edzés csak az eNOS fehérje expressziójában okozott emelkedést, míg a cNOS és az iNOS változatlan maradt a miokardiumban (Husain 2004). Minthogy az eddigi irodalmi adatok irányítottan végzett úsztatásra és futópados futtatásra vonatkoznak, ezért megnéztük, hogy egy más jellegű, szabadon végzett mozgásprogram hogyan hat a cNOS aktivitására. Azt tapasztaltuk, hogy a 6 hetes futókerékben végzett futás szignifikáns emelkedést okozott a cNOS aktivitásában szív bal kamrában.

A kardiovaszkuláris rendszer mellett kíváncsiak voltunk, hogy a bélrendszerben milyen hatással van a futókerékben végzett mozgás az akut gyulladásra. Két olyan

szervrendszert választottunk tehát vizsgálatunk tárgyául, melyekben fizikai aktivitás során ellentétesen változik a vérellátás. Míg a szívet ellátó koronáriákon átáramló vér mennyisége megnő (Laughlin, Bowles et al. 2012), addig a bélrendszer vérellátása lecsökken (van Wijck, Lenaerts et al. 2011). Az aortagyűrű kontrakció vizsgálatok eredményeihez hasonlóan a bél gyulladásos megbetegedéseiben is van nemek szerinti különbség, nőstényeknél a nemi hormonok befolyásolják a gyulladás súlyosságát (Berkó, Horváth et al. 2005, Houdeau, Moriez et al. 2007, Voss, Lewerenz et al. 2012), így további vizsgálatainkat is hím állatokon végeztük.

A kísérletek teljes időtartama alatt monitoroztuk az állatok testtömegét. A nem-futó és a futó csoport állatainak testtömege közel azonos mértékben gyarapodott a 6 hét alatt. Feltehetően a testösszetételben, a zsír és a vázizom arányában alakulhatott ki különbség a két csoport állatai között, azonban erre irányuló méréseket nem végeztünk. A szakirodalomnak megfelelően a TNBS kezelés szignifikáns fogyást eredményezett mind a futó, mind pedig a nem-futó állatoknál az abszolút kontroll csoporthoz képest (Waldner and Neurath 2009), azonban a futó csoport esetében a harmadik napon megállt a testtömeg csökkenése. A fogyás jól korrelál a betegség súlyosságával (Xiong, Lin et al. 2013), hátterében a kezelés következtében kialakuló hasmenés illetve a rossz közérzet miatt lecsökkent étvágy állhat, ami a gyulladás mérséklődésével javul.

Vizsgálatainkban először a futókerékkel felszerelt ketrecekben töltött időt határoztuk meg. A szakirodalomban az egerekkel és patkányokkal végzett krónikus mozgásprogramok többnyire 4 illetve 6 hétig tartottak, és gyulladáscsökkentőnek bizonyultak a dextrán szodium szulfát vagy ecetsav kiváltotta vastagbélgyulladásban (Kasimay, Guzel et al. 2006, Sun, Zhong et al. 2008, Saxena, Fletcher et al. 2012, Cook,

Martin et al. 2013). Ezért 3, 6 és 10 hétig futókerékkel felszerelt ketrecekben szabadon futhattak az állatok, majd ezt követően kezeltük őket TNBS-val. A TNBS kezelés következtében az állatoknál jellemzően előfordul a hasmenés és a fogyás, melynek pathomechanizmusában a RONS is szerepet játszanak (Xavier and Podolsky 2007, Khor, Gardet et al. 2011, Shi, Winston et al. 2011). Xuan-Zheng Shi és munkatársai igazolták, hogy a TNBS a bélfal mélyebb rétegeire is kiterjedő gyulladást okoz: a neutrofil leukociták infiltrációját jelző MPO aktivitás a vastagbél mukóza/szubmukóza rétegén kívül a muszkuláris externa rétegében is szignifikánsan megemelkedik a kontroll csoporthoz képest, s a legmagasabb aktivitásértéket a harmadik napon mutatja (Shi, Winston et al. 2011). Ezért kísérleteinkben a mintavétel a TNBS kezelést követő harmadik napon történt. A 8 cm-es vastagbél szakaszokról készült fotók alapján meghatározott makroszkopikus gyulladás paraméterek alapján a 3 hétig tartó futás nem okozott változást, míg a 6 és 10 hétig futó állatoknál szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a gyulladás kiterjedésében és súlyosságában. A 6 és 10 hetes mintákból meghatároztuk a neutrofil infiltrációt jelző MPO aktivitást is, amely szignifikánsan csökkent összhangban a makroszkopikus gyulladás faktorokkal. Ezen eredmények alapján további kísérleteinkhez és méréseinkhez a 6 hetes futás protokollt választottuk.

Ismert, hogy a gyulladásos kaszkád során, illetve fizikai aktivitás végzésekor is keletkeznek RONS. Azonban míg a gyulladásos folyamatban felborul az antioxidáns és prooxidáns egyensúly, addig a szabadidős mozgás során keletkező RONS, melyek fő forrásai a működő vázizom és a szívizom, beindítják az antioxidáns védekező mechanizmusokat (Gomez-Cabrera, Domenech et al. 2008, Scheele, Nielsen et al. 2009). Számos tanulmány beszámolt róla, hogy a mérsékelt intenzitású, rendszeresen végzett

fizikai aktivitás képes indukálni az antioxidáns folyamatokat különböző szervekben. Brooks és mtsai. egereken végzett kísérletében a 8 hétig tartó futópados mozgás lecsökkentette a működő vázizmokból felszabaduló RONS mennyiségét és megnövelte azok antioxidáns glutathion tartalmát (Brooks, Vasilaki et al. 2008). George és mtsai. patkány vérplazmában és vese proximális tubulusokban mértek emelkedett SOD és HO expressziót és aktivitást 12 hetes futópados futást követően (George, Lokhandwala et al. 2009). Ezért azt vizsgáltuk továbbá, hogyan befolyásolja az antioxidáns HO és a NOS enzimek aktivitását a szabadidős testmozgás a vastagbélben.

A HO enzim aktivitását patkány vastagbélben a mozgás és az akut gyulladás is fokozta. Feltehetően a mozgás következtében tapasztalt emelkedett aktivitást a HO-1 izoformát indukáló faktorok: a bélrendszerben fellépő hipoxiás állapot, illetve az oxidatív stressz együttesen okozhatta. Hoffman-Goetz és mtsai. egerekben vizsgálták a 16 hétig tartó futókerekes mozgás SOD, kataláz és glutathion-peroxidáz expresszióját fokozó hatását a bélrendszerben jelenlevő limfocitákban (Hoffman-Goetz, Pervaiz et al. 2009). Azonban kevés adat áll rendelkezésünkre a mozgás indukálta HO aktivitás szerepéről bélgyulladásban, holott a HO indukáló szerek gyulladáscsökkentő hatása különböző colitis állatmodellekben bizonyított (Yukitake, Kimura et al. 2011). Özgür Kasimay és mtsai. ecetsav indukálta colitis modellben azt találták, hogy a rendszeres mozgás következtében a glutathion-tartalom nő, míg a gyulladás csökken (Kasimay, Guzel et al. 2006). Eredményeink és a korábbi adatok alapján feltételezhetjük, hogy a szabadidős testmozgás az antioxidáns védő enzimek és molekulák, köztük az általunk vizsgált HO enzim aktivitásának indukcióján keresztül is kifejti gyulladáscsökkentő hatását a vastagbélben. A

pontos molekuláris útvonalak azonban, amelyek a HO aktivitásának fokozódásához vezetnek, még tisztázásra várnak.

Vizsgálatok igazolták a rendszeres mozgás jótékony hatását a vastagbél-daganat megelőzésében, amely feltehetően az iNOS expresszió gátlásán keresztül is megvalósul (Aoi, Naito et al.). Kimutatták, hogy szisztémásan, humán CD34+ perifériás vér mononukleáris sejtekben a rendszeres fizikai aktivitás hatására megemelkedik az eNOS és csökken az iNOS expressziója (Jenkins, Landers et al. 2011). Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a szabadon végzett, hosszantartó mozgás az akut gyulladásos folyamatban milyen változást okoz a cNOS és az iNOS aktivitásában vastagbélben. A mozgás a cNOS aktivitását szignifikánsan megemelte, míg az iNOS aktivitásában nem okozott változást a vastagbélben. A TNBS kezelés hatására a vastagbélben a csökkent cNOS és az emelkedett iNOS aktivitás megegyezik korábbi állatkísérletes eredményekkel (Porrás, Martin et al. 2006). Kísérletes bélgyulladás modellekben vizsgált több bélgyulladást csökkentő anyag esetén mértek csökkent iNOS aktivitást (Clemente, Dos Santos et al. 2012, Xing, Sun et al. 2012). A konstitutívan expresszáldó eNOS izoforma védő szerepét is igazolták, ugyanis Sasaki és mtsai. fokozott gyulladásos választ kaptak az eNOS génkiütött egerekben indukált vastagbélgyulladásnál (Sasaki, Bharwani et al. 2003). Bár erre irányuló vizsgálatokat nem végeztünk, a szakirodalomban leírták, hogy a HO és a NOS rendszer kölcsönösen hat egymásra. A gyulladt bélben a NO hatására megnő a HO-1 mRNS expressziója (Durante, Kroll et al. 1997), ugyanakkor a HO-1 protektív szerepe úgy is megnyilvánul, hogy gátolja az iNOS expresszióját (Wang, Guo et al. 2001). A HO-1 és az iNOS ellentétes szabályozás alatt áll a bél epitel sejtekben, ha azok citokineknek vagy

oxidatív stressznek vannak kitéve, mellyel egy ellentétesen működő védelmi mechanizmust biztosít a két rendszer (Dijkstra, Blokzijl et al. 2004).

IBD betegek bélrendszeréből vett kapillárisokra az endoteliális diszfunkció jellemző, amelyet a cNOS által termelt NO-függő vazodilatáció hiánya következtében kialakult csökkent perfúzió, a sebgyógyulásban bekövetkező zavar és a krónikus gyulladás fenntartása is okozhat (Hatoum, Binion et al. 2003, Horowitz, Binion et al. 2007). A nem-futó TNBS és a futó TNBS csoportokban ellentétes változást tapasztaltunk a cNOS és az iNOS aktivitás változásában. A TNBS kezelés hatására lecsökkent cNOS aktivitás értéket az előzetesen végzett 6 hetes mozgás meg tudta tartani a kontroll szinten. Ezzel ellentétben az iNOS aktivitását a TNBS kezelés nagymértékben megemelte, ám a megelőző hosszantartó mozgásprogram szignifikánsan le tudta csökkenteni ezt a magas értéket. Feltételezhetjük, hogy az általunk mért változások a különböző NOS izoformák aktivitásában, hozzájárulnak a szabadidős testmozgás gyulladáscsökkentő hatásához (Szalai, Szasz et al. 2014).

6. Következtetések

Eredményeink alapján a következőket állapíthatjuk meg.

A szív-és érrendszerre vonatkozóan:

1. A HO rendszer részt vesz az ér kontrakció szabályozásában.
2. Az ér kontrakcióban nemek közti különbség mutatkozik. A HO rendszer aktivitásának blokkolása az eltérést csökkenti.
3. A 6 hetes futókerékben végzett mozgás fokozza a HO aktivitását hasi aortában és szív bal kamrában.
4. A 6 hetes futókerékben végzett mozgás fokozza a cNOS aktivitását hasi aortában és szív bal kamrában.

A vastagbélre vonatkozóan:

5. . A futókerékben végzett 6 hetes mozgás nem befolyásolta az állatok testtömegét sem a hatodik hét végére, sem a TNBS kezelést követően.
6. A 3 hetes szabadidős testmozgás nem elegendő az antioxidáns rendszerek aktiválásához.

7. A szabadidős testmozgás gyulladáscsökkentőnek bizonyult, ha 6 illetve 10 héten át tartott: csökkent a TNBS indukálta vastagbélgyulladás makroszkopikusan megfigyelhető kiterjedése és súlyossága, továbbá a MPO enzim aktivitása.
8. 6 hetes futókerékben végzett mozgás indukálta folyamatok következtében megemelkedik a HO aktivitás a vastagbélben.
9. A TNBS kiváltotta HO aktivitás emelkedését a 6 hetes szabadidős testmozgás nem emeli meg szignifikánsan.
10. A 6 hetes szabadidős testmozgás fokozza a cNOS aktivitását a vastagbélben.
11. A 6 hetes szabadidős testmozgás nem befolyásolja az iNOS aktivitását a vastagbélben.
12. A 6 hetes szabadidős testmozgás után TNBS-val kiváltott gyulladásnál magasabb cNOS és alacsonyabb iNOS aktivitás tapasztalható a mozgást nem végző állatokhoz képest.

7. Összefoglalás

Irodalmi háttér: A szabadidős testmozgás protektív, megelőző szerepét számos krónikus betegségben leírták, többek között szív- és érrendszeri megbetegedésekben, vastagbél-daganatnál, azonban a rekreációs mozgás által befolyásolt folyamatok egyes részletei, összefüggései még tisztázásra várnak mind a kardiovaszkuláris, mind pedig a gyomor-bélrendszerben. A fizikai aktivitás kismértékű oxidatív stresszt okoz, amire a szervezet az antioxidáns védekező rendszer fokozott aktivitásával válaszol. A mozgás szisztémás gyulladáscsökkentő hatással is bír azáltal, hogy a proinflammatorikus és anti-inflammatorikus citokin / kemokin egyensúlyt pozitívan befolyásolja. Az azonban kevésbé ismert, hogy a rekreációs testmozgás milyen hatással van az akut vastagbélgyulladásra.

Célkitűzések: Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy

1. A HO termelte CO-nak van-e szerepe az ér átmérőjének szabályozásában hasi aortában, továbbá van-e nemek közötti különbség a HO rendszer gátlását követően az aortagyűrű AVP-re adott kontrakciós válaszában.
2. A 6 hetes szabadidős testmozgás milyen hatással van a kardiovaszkuláris rendszerben – hasi aortában és szív bal kamrában - a HO és a cNOS enzimek aktivitására.
3. A 3/ 6/ 10 héten át végzett szabadidős testmozgás milyen hatással van a vastagbélben kiváltott akut gyulladásra.
4. A 6 hetes szabadidős testmozgás hogyan befolyásolja az akut gyulladásos folyamatban a HO és a cNOS/ iNOS enzimek aktivitását.

Módszerek: Az aortagyűrű vizsgálatokhoz hím és nőstény Wistar patkányokat használtunk, 24 és 1 órás SnPP előkezelést (30 mg/kg, s.c., pH 7,4) követően mértük az AVP-re (2,0 µg/ml) adott kontrakciós választ.

További kísérleteinkhez hím állatokat használtunk. A szabadidős mozgást úgy modelleztük, hogy az állatokat futókerékkel felszerelt ketrecekben tartottuk a kísérletek teljes ideje alatt, míg a nem-futó állatok hagyományos ketrecekben voltak. 6 hetes szabadidős mozgást követően kivettük az állatok hasi aortáját és szív bal kamráját. A mintákból meghatároztuk a HO (keletkezett bilirubin spektrofotometriás mérése) és a cNOS aktivitásokat (L-citrullin L-arginin módszer).

3, 6 és 10 hetes futást követően kezeltük a megfelelő csoportokat TNBS-val. A vastagbélgyulladást 10 mg, 50 %-os ethanolban oldott, 0,25 ml térfogatban beadott TNBS-val váltottuk ki, a kezelés előtt 12 órával az állatokat éhezettük. A mintavétel a TNBS kezelést követően 72 órával történt, kivettük az állatok vastagbelének végbéltől számított 8 cm-es szakaszát. A vastagbél-mintákból meghatároztuk a nyálkahártyagyulladás makroszkópikus paramétereit (súlyossági skála, lézió) és spektrofotometriás módszerrel a MPO enzim aktivitását. A hat hetes szabadidős testmozgást végző állatok mintáiból mértük a HO, cNOS és iNOS aktivitásokat.

Eredmények

Az aortagyűrű AVP kezelésre adott kontrakciója fokozódott, ha a HO aktivitás gátlószerével, SnPP-nel előkezelést végeztünk. A hímek és nőstények között tapasztalt szignifikáns különbséget a HO aktivitás blokkolásával megszüntettük.

A kardiovaszkuláris rendszerben a 6 hetes szabadidős testmozgást követően szignifikánsan megemelkedett a HO és a cNOS aktivitása hasi aortában és szív bal kamrában.

Az előzetesen végzett 6 és 10 hétig tartó futás szignifikánsan csökkentette a kiváltott vastagbélgyulladás kiterjedését és súlyosságát, illetve a MPO aktivitását, viszont a 3 hetes szabadidős testmozgás nem csökkentette a vastagbélgyulladást. További vizsgálatainkhoz a 6 hetes futás protokollt alkalmaztuk.

A 6 hétig tartó futás önmagában mintegy háromszorosára megemelte a HO aktivitást a vastagbélben az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva. A gyulladást követően kialakuló magas HO aktivitást a futás kis mértékben fokozta. Kontroll állatokban cNOS aktivitását a futás szignifikánsan megemelte mind a futó kontroll, mind a futó TNBS csoportban a megfelelő nem-futó csoportokhoz viszonyítva. A gyulladással járó folyamat a cNOS alapaktivitásának csökkenését eredményezte, ám az előzetesen végzett mozgás következtében emelkedett alap cNOS aktivitást csupán a kontroll szintig csökkentette. Az iNOS aktivitásában a gyulladás szignifikáns emelkedést okozott. A mozgás pozitív hatása ezen enzim esetén is megmutatkozott, mivel csökkentette az iNOS aktivitásának nagyfokú megemelkedését.

Eredmények megbeszélése

Az aortagyűrű-kontrakció vizsgálatok igazolták, hogy a HO enzim is részt vesz az aorta kontrakciójának szabályozásában. A HO aktivitás blokkolása megszünteti az AVP-re adott kontrakciós válaszban megmutatkozó nemek közötti különbséget. Továbbá ezen eredmények is alátámasztják, hogy hímek esetén nagyobb a rizikó a kardiovaszkuláris megbetegedésekre. A 6 hetes futókerékben végzett futás aortában és szív bal kamrában fokozta a HO és a cNOS enzimek aktivitását. A HO és a NOS katalizálta folyamatban keletkező vazoaktív gázok, a CO és a NO egyaránt szerepet játszhat a vérkeringés fizikai aktivitáshoz igazításában.

A vastagbél mintákból végzett méréseink alapján elmondhatjuk, hogy a 3 hetes szabadidős testmozgás nem elegendő az antioxidáns rendszerek aktiválásához. A szabadidős testmozgás gyulladáscsökkentőnek bizonyult, ha 6 illetve 10 héten át tartott: csökkent a TNBS indukálta vastagbélgyulladás makroszkopikusan megfigyelhető kiterjedése és súlyossága, továbbá a MPO enzim aktivitása. A 6 hetes futókerékben végzett mozgás indukálta folyamatok következtében megemelkedik a HO és a cNOS aktivitás, míg az iNOS aktivitás nem változik a vastagbélben. A TNBS kiváltotta HO aktivitás emelkedését a 6 hetes szabadidős testmozgás nem emeli meg szignifikánsan. A mozgás hatására megemelkedett cNOS aktivitás miatt, a TNBS által kiváltott gyulladás miatti cNOS aktivitás csökkenés után a cNOS aktivitás értékek a normál szinten maradtak. A mozgás következtében kialakuló magasabb enzim szintek és aktivitások (HO, cNOS) miatt kisebb gyulladások alakultak ki, ami a kisebb iNOS aktivitás értékben is megmutatkozott.

Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a különböző NOS és HO izoformák aktivitásában mért változások hozzájárulnak a szabadidős testmozgás gyulladáscsökkentő hatásához.

8. Summary

Introduction: The beneficial effects of recreational exercise training on chronic diseases such as cardiovascular complications and colon cancer has been demonstrated. On the other hand the underlying mechanisms induced by recreational exercise in the cardiovascular system and in the gastrointestinal tract have not been elucidated. Oxidative stress caused by moderate physical activity induces the antioxidant defense mechanisms. Exercise has an anti-inflammatory effect through the modulation of cytokine – chemokine balance. Oxidative stress and inflammatory cytokines and chemokines play role in the pathomechanisms of acute colitis. The impact of recreational physical activity on acute colonic inflammation is not well established.

Aims: Our aims was to investigate

1. the effects of HO inhibitor, tin-protoporphyrin IX (SnPP), which is the inhibitor of the heme oxygenase (HO) activity on aorta ring contraction in male and female rats
2. the effects of 6 week-voluntary exercise on activities of HO and constitutive nitric oxide synthase (cNOS) in abdominal aorta and heart left ventricle.
3. the effects of 3/ 6/ 10 weeks of voluntary exercise on acute colonic inflammation.
4. the effects of 6 weeks of voluntary exercise on the activity of HO, cNOS and inductive nitric oxide synthase (iNOS) enzymes in the inflamed colon.

Methods: Aorta ring contraction was provoked by arginine vasopressin (AVP; 2,0 µg/ ml). HO activity was inhibited by SnPP (30 mg/ kg, s.c., pH 7.4) 24 hours and 1 hour before measurements in male and female Wistar rats.

To study the effect of voluntary physical exercise we used male Wistar rats which were divided into non-running and running groups. Running rats were placed into cages installed with a running wheel. After 6 weeks of voluntary exercise period abdominal aorta and heart left ventricle were removed. HO activity (bilirubin formation) and cNOS activity (conversion of [^{14}C]-radiolabelled L-arginine to L-citrulline) were measured.

After 3, 6 or 10 weeks of voluntary exercise colitis was induced by 2,4,6 trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS; once 10 mg in 0.25 ml of 50% ethanol, v/v). Food was withdrawn overnight before TNBS challenge. 72 hours after the induction of colitis colon samples were collected and colonic damage, lesion and enzyme activities (myeloperoxidase enzyme - MPO, HO, cNOS, iNOS) were measured.

Results of cardiovascular measurements:

SnPP pretreatment increased aortic ring contraction induced by AVP in male and female rats. Inhibition of HO activity abolished the gender differences.

The 6 week-voluntary exercise caused a significant augmentation in the activity of HO and cNOS in aorta and heart left ventricle.

Results of colonic measurements:

Colonic damage and lesion induced by TNBS treatment were not influenced by 3 week-voluntary exercise. On the other hand, 6 and 10 weeks of running decreased the extent of lesions, severity of mucosal damage and the activity of MPO. For the further investigations we used 6 week-running protocol.

After 6 week-running there were no differences in the body weight between non-running and running animals. While there was a progressive fall in body weight after the induction of colonic inflammation in the TNBS treated group, voluntary training attenuated this

decrease of body weight of TNBS challenged rats. 6 weeks of running caused significant increase in colonic HO activity compared to the absolute control group. Treatment with TNBS alone led to even higher HO activity, and there was no significant difference between the running TNBS group and the non-running TNBS animals.

6 weeks of running elevated cNOS activity significantly in the running control and the running TNBS groups compared to the proper non-running groups. In the non-running TNBS group, we measured a significantly decreased cNOS activity compared to the non-treated control group. Voluntary exercise before TNBS administration augmented the low cNOS activity. TNBS challenge significantly elevated iNOS activity independently from exercise. Importantly, 6 week-running before TNBS treatment significantly reduced this increase of iNOS activity.

Discussion: The inhibition of HO activity increased aortic ring contraction induced by AVP and there were gender differences. These results suggest that males are more susceptible for cardiovascular diseases.

The increased HO and cNOS activities in aorta and cardiac left ventricle reflect the role of vasoactive gases, carbon monoxide and nitric oxide produced by HO and NOS enzymes in the adaptation of cardiovascular system to physical activity.

The macroscopic parameters of inflammation and results of MPO activity show that 6 and 10 weeks of wheel running have anti-inflammatory effects on acute colitis in rats. 6 weeks of freewheel running alone increased the activity of HO and cNOS and did not change the activity of iNOS. The 6 weeks of running did not cause differences in the HO activity induced by TNBS treatment. Voluntary exercise before TNBS administration increased cNOS and decreased iNOS activity compared to sedentary TNBS treated group.

Reactive oxygen and nitrogen free radicals produced during recreational physical exercise may play a role in the augmentation of the activity of HO and NOS. Moreover, it is suggested that the anti-inflammatory effect of recreational physical exercise in rat colon is associated with augmented cNOS activity and lowered iNOS activity.

In our study we demonstrated that 6 weeks of running wheel exercise protocol is effective to activate beneficial mechanisms in the protection of the examined systems, mentioned above.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani tanszékvezetőnknek: Prof. Dr. Toldi Józsefnek

témavezetőimnek: Dr. Varga Csabának, Dr. Pósa Anikónak, Kedvesné Dr. Kupai Krisztinának témavezetői munkájukért, tanácsaikért, építő kritikáikért

†Prof. Dr. László Ferencnek és Prof. Dr. László Ferenc A.-nak

laborunk egykori és jelenlegi munkatársainak: Csonka Anettnek, Daruka Lejlának, Dr. Deim Zoltánnak, Dr. Hegyköziné Veszélka Médeának, Dr. Horváth Krisztinának, Juhász Katalinnak, Karcsúné Dr. Kis Gyöngyinek, Pallagi Évának, Magyar Ferencnek, Magyariné Berkó Anikónak, Magyar Mónikának, Dr. Molnár Andornak, Szabó Györgyinek, Szabó Renátának, Török Szilviának a sok segítségért,

Juhász Katalinnak és Veketyné Váradi Margitnak az adminisztrációs segítségért és az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi dolgozójának.

Szüleimnek és testvéreimnek szerető támogatásukért.

A kísérletek elvégzéséhez a következő pályázatok nyújtottak anyagi támogatást:

TÁMOP 4.2.1./B-09-1/KNOV-210-0005

TÁMOP 4.2.2.-08/1-2008-0006

TÁMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0012

10. Irodalomjegyzék

- Abraham, N. G. and A. Kappas (2008). "Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase." Pharmacol Rev **60**(1): 79-127.
- Achitei, D., A. Ciobica, G. Balan, E. Gologan, C. Stanciu and G. Stefanescu (2013). "Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients." Dig Dis Sci **58**(5): 1244-1249.
- Al-Nassan, S., N. Fujita, H. Kondo, S. Murakami and H. Fujino (2012). "Chronic Exercise Training Down-Regulates TNF-alpha and Atrogin-1/MAFbx in Mouse Gastrocnemius Muscle Atrophy Induced by Hindlimb Unloading." Acta Histochem Cytochem **45**(6): 343-349.
- Ancha, H. R., R. R. Kurella, C. C. McKimmey, S. Lightfoot and R. F. Harty (2009). "Effects of N-acetylcysteine plus mesalamine on prostaglandin synthesis and nitric oxide generation in TNBS-induced colitis in rats." Dig Dis Sci **54**(4): 758-766.
- Aoi, W., Y. Naito, T. Takagi, S. Kokura, K. Mizushima, Y. Takanami, Y. Kawai, Y. Tanimura, L. P. Hung, R. Koyama, H. Ichikawa and T. Yoshikawa "Regular exercise reduces colon tumorigenesis associated with suppression of iNOS." Biochem Biophys Res Commun **399**(1): 14-19.
- Aoi, W., Y. Naito, T. Takagi, S. Kokura, K. Mizushima, Y. Takanami, Y. Kawai, Y. Tanimura, L. P. Hung, R. Koyama, H. Ichikawa and T. Yoshikawa (2010). "Regular exercise reduces colon tumorigenesis associated with suppression of iNOS." Biochem Biophys Res Commun **399**(1): 14-19.
- Arijs, I., G. De Hertogh, K. Machiels, K. Van Steen, K. Lemaire, A. Schraenen, L. Van Lommel, R. Quintens, G. Van Assche, S. Vermeire, F. Schuit and P. Rutgeerts (2011). "Mucosal gene expression of cell adhesion molecules, chemokines, and chemokine receptors in patients with inflammatory bowel disease before and after infliximab treatment." Am J Gastroenterol **106**(4): 748-761.
- Arikawa, A. Y., W. Thomas, K. H. Schmitz and M. S. Kurzer (2011). "Sixteen weeks of exercise reduces C-reactive protein levels in young women." Med Sci Sports Exerc **43**(6): 1002-1009.
- Asami, S., T. Hirano, R. Yamaguchi, Y. Tsurudome, H. Itoh and H. Kasai (1998). "Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs." Biochem Biophys Res Commun **243**(3): 678-682.
- Baccari, M. C., C. Traini, R. Garella, G. Cipriani and M. G. Vannucchi (2012). "Relaxin exerts two opposite effects on mechanical activity and nitric oxide synthase expression in the mouse colon." Am J Physiol Endocrinol Metab **303**(9): E1142-1150.

Bagyanszki, M. and N. Bodi (2012). "Diabetes-related alterations in the enteric nervous system and its microenvironment." World J Diabetes **3**(5): 80-93.

Balligand, J. L., O. Feron and C. Dessy (2009). "eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues." Physiol Rev **89**(2): 481-534.

Balligand, J. L., D. Ungureanu-Longrois, W. W. Simmons, D. Pimental, T. A. Malinski, M. Kapturczak, Z. Taha, C. J. Lowenstein, A. J. Davidoff, R. A. Kelly and et al. (1994). "Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro." J Biol Chem **269**(44): 27580-27588.

Bartho, L. and R. A. Lefebvre (1995). "Nitric oxide-mediated contraction in enteric smooth muscle." Arch Int Pharmacodyn Ther **329**(1): 53-66.

Barton, S. G., D. S. Rampton, V. R. Winrow, P. Domizio and R. M. Feakins (2003). "Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study." Cell Stress Chaperones **8**(4): 329-334.

Bataille, A. M. and J. E. Manautou (2012). "Nrf2: a potential target for new therapeutics in liver disease." Clin Pharmacol Ther **92**(3): 340-348.

Beck, P. L., R. Xavier, J. Wong, I. Ezedi, H. Mashimo, A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, A. K. Bhan and D. K. Podolsky (2004). "Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **286**(1): G137-147.

Bellner, L., K. A. Patil, K. Castellano, A. Halilovic, M. W. Dunn and M. L. Schwartzman (2011). "Targeted suppression of HO-2 gene expression impairs the innate anti-inflammatory and repair responses of the cornea to injury." Mol Vis **17**: 1144-1152.

Berkó, A., K. Horváth, J. Whittle Brendan, F. ifj László and C. Varga (2005). "Az endogén ösztrogén védő szerepe TNBS kiváltotta vastagbélgyulladásokban."

Boughton-Smith, N. K., S. M. Evans, F. Laszlo, B. J. Whittle and S. Moncada (1993). "The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat." Br J Pharmacol **110**(3): 1189-1195.

Boughton-Smith, N. K., J. L. Wallace, G. P. Morris and B. J. Whittle (1988). "The effect of anti-inflammatory drugs on eicosanoid formation in a chronic model of inflammatory bowel disease in the rat." Br J Pharmacol **94**(1): 65-72.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

- Bradley, P. P., D. A. Priebat, R. D. Christensen and G. Rothstein (1982). "Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker." J Invest Dermatol **78**(3): 206-209.
- Brocardo, P. S., F. Boehme, A. Patten, A. Cox, J. Gil-Mohapel and B. R. Christie (2012). "Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise." Neuropharmacology **62**(4): 1607-1618.
- Brooks, S. V., A. Vasilaki, L. M. Larkin, A. McArdle and M. J. Jackson (2008). "Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor kappaB activation." J Physiol **586**(16): 3979-3990.
- Brutsaert, D. L. (2003). "Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity." Physiol Rev **83**(1): 59-115.
- Butts, J. F., M. H. Belfer and K. B. Gebke (2013). "Exercise for patients with COPD: an integral yet underutilized intervention." Phys Sportsmed **41**(1): 49-57.
- Chatterjee, A., S. M. Black and J. D. Catravas (2008). "Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation." Vascul Pharmacol **49**(4-6): 134-140.
- Clemente, T. R., A. N. Dos Santos, J. N. Sturaro, E. M. Gotardo, C. C. de Oliveira, S. C. Acedo, C. R. Caria, J. Pedrazzoli, Jr., M. L. Ribeiro and A. Gambero (2012). "Infliximab modifies mesenteric adipose tissue alterations and intestinal inflammation in rats with TNBS-induced colitis." Scand J Gastroenterol **8-9**(47): 943-950.
- Colberg, S. R., R. J. Sigal, B. Fernhall, J. G. Regensteiner, B. J. Blissmer, R. R. Rubin, L. Chasan-Taber, A. L. Albright, B. Braun, M. American College of Sports and A. American Diabetes (2010). "Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement executive summary." Diabetes Care **33**(12): 2692-2696.
- Committee, P. A. G. A. (2008). Physical Activity Guidelines Advisory Committee Report, 2008. Washington, U.S. Department of Health and Human Services.
- Cook, M. D., S. A. Martin, C. Williams, K. Whitlock, M. A. Wallig, B. D. Pence and J. A. Woods (2013). "Forced treadmill exercise training exacerbates inflammation and causes mortality while voluntary wheel training is protective in a mouse model of colitis." Brain Behav Immun **33**: 46-56.
- Criswell, D., S. Powers, S. Dodd, J. Lawler, W. Edwards, K. Renshler and S. Grinton (1993). "High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity." Med Sci Sports Exerc **25**(10): 1135-1140.

Cromer, W. E., J. M. Mathis, D. N. Granger, G. V. Chaitanya and J. S. Alexander (2011). "Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases." World J Gastroenterol **17**(5): 578-593.

Danese, S. (2011). "Role of the vascular and lymphatic endothelium in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: 'brothers in arms'." Gut **60**(7): 998-1008.

Danson, E. J., J. K. Choate and D. J. Paterson (2005). "Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function." Pharmacol Ther **106**(1): 57-74.

Davies, K. J., A. T. Quintanilha, G. A. Brooks and L. Packer (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." Biochem Biophys Res Commun **107**(4): 1198-1205.

Davis, B., T. Moriguchi and B. Sumpio (2013). "Optimizing Cardiovascular Benefits of Exercise: A Review of Rodent Models." Int J Angiol **22**(1): 13-22.

De Filippo, K., A. Dudeck, M. Hasenberg, E. Nye, N. van Rooijen, K. Hartmann, M. Gunzer, A. Roers and N. Hogg (2013). "Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation." Blood **121**(24): 4930-4937.

Derbyshire, E. R. and M. A. Marletta (2012). "Structure and regulation of soluble guanylate cyclase." Annu Rev Biochem **81**: 533-559.

Dhaliwal, S. S., T. A. Welborn and P. A. Howat (2013). "Recreational physical activity as an independent predictor of multivariable cardiovascular disease risk." PLoS One **8**(12): e83435.

Di Francescomarino, S., A. Sciartilli, V. Di Valerio, A. Di Baldassarre and S. Gallina (2009). "The effect of physical exercise on endothelial function." Sports Med **39**(10): 797-812.

Dijkstra, G., H. Blokzijl, L. Bok, M. Homan, H. van Goor, K. N. Faber, P. L. Jansen and H. Moshage (2004). "Opposite effect of oxidative stress on inducible nitric oxide synthase and haem oxygenase-1 expression in intestinal inflammation: anti-inflammatory effect of carbon monoxide." J Pathol **204**(3): 296-303.

Dijkstra, G., S. Yuvaraj, H. Q. Jiang, J. C. Bun, H. Moshage, N. Kushnir, M. P. Peppelenbosch, J. J. Cebra and N. A. Bos (2007). "Early bacterial dependent induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in epithelial cells upon transfer of CD45RB(high) CD4(+) T cells in a model for experimental colitis." Inflamm Bowel Dis **13**(12): 1467-1474.

Dong, J., P. Chen, R. Wang, D. Yu, Y. Zhang and W. Xiao (2011). "NADPH oxidase: a target for the modulation of the excessive oxidase damage induced by overtraining in rat neutrophils." Int J Biol Sci **7**(6): 881-891.

Dudzinski, D. M. and T. Michel (2007). "Life history of eNOS: partners and pathways." Cardiovasc Res **75**(2): 247-260.

Dunn, L. L., R. G. Midwinter, J. Ni, H. A. Hamid, C. R. Parish and R. Stocker (2014). "New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1." Antioxid Redox Signal **20**(11): 1723-1742.

Duran, W. N., J. W. Breslin and F. A. Sanchez (2010). "The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability." Cardiovasc Res **87**(2): 254-261.

Durante, W., M. H. Kroll, N. Christodoulides, K. J. Peyton and A. I. Schafer (1997). "Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells." Circ Res **80**(4): 557-564.

Ellison, G. M., C. D. Waring, C. Vicinanza and D. Torella (2012). "Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms." Heart **98**(1): 5-10.

Emami, C. N., N. Chokshi, J. Wang, C. Hunter, Y. Guner, K. Goth, L. Wang, A. Grishin and H. R. Ford (2012). "Role of interleukin-10 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis." Am J Surg **203**(4): 428-435.

Fehrenbach, E., A. M. Niess, F. Passek, S. Sorichter, A. Schwirtz, A. Berg, H. H. Dickhuth and H. Northoff (2003). "Influence of different types of exercise on the expression of haem oxygenase-1 in leukocytes." J Sports Sci **21**(5): 383-389.

Feron, O., L. Belhassen, L. Kobzik, T. W. Smith, R. A. Kelly and T. Michel (1996). "Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells." J Biol Chem **271**(37): 22810-22814.

Feron, O. and R. A. Kelly (2001). "The caveolar paradox: suppressing, inducing, and terminating eNOS signaling." Circ Res **88**(2): 129-131.

Fleming, I., B. Fisslthaler, M. Dixit and R. Busse (2005). "Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells." J Cell Sci **118**(Pt 18): 4103-4111.

Forstermann, U., J. P. Boissel and H. Kleinert (1998). "Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III)." FASEB J **12**(10): 773-790.

George, L., M. F. Lokhandwala and M. Asghar (2009). "Exercise activates redox-sensitive transcription factors and restores renal D1 receptor function in old rats." Am J Physiol Renal Physiol **297**(5): F1174-1180.

Gilchrist, M., S. D. McCauley and A. D. Befus (2004). "Expression, localization, and regulation of NOS in human mast cell lines: effects on leukotriene production." Blood **104**(2): 462-469.

Golbidi, S., M. Badran and I. Laher "Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients." Exp Diabetes Res **2012**: 941868.

Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech and J. Vina (2008). "Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training." Free Radic Biol Med **44**(2): 126-131.

Gonzalez-Mauraza, H., C. Martin-Cordero, C. Alarcon-de-la-Lastra, M. A. Rosillo, A. J. Leon-Gonzalez and M. Sanchez-Hidalgo (2014). "Anti-inflammatory effects of Retama monosperma in acute ulcerative colitis in rats." J Physiol Biochem **70**(1): 163-172.

Guo, Y., N. Lu and A. Bai (2013). "Clinical use and mechanisms of infliximab treatment on inflammatory bowel disease: a recent update." Biomed Res Int **2013**: 581631.

Hata, F., T. Ishii, A. Kanada, N. Yamano, T. Kataoka, T. Takeuchi and O. Yagasaki (1990). "Essential role of nitric oxide in descending inhibition in the rat proximal colon." Biochem Biophys Res Commun **172**(3): 1400-1406.

Hatoum, O. A., D. G. Binion, M. F. Otterson and D. D. Gutterman (2003). "Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: Loss of nitric oxide-mediated vasodilation." Gastroenterology **125**(1): 58-69.

Haverkamp, S. and W. D. Eldred (1998). "Localization of nNOS in photoreceptor, bipolar and horizontal cells in turtle and rat retinas." Neuroreport **9**(10): 2231-2235.

Hayashi, S., Y. Omata, H. Sakamoto, Y. Higashimoto, T. Hara, Y. Sagara and M. Noguchi (2004). "Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene." Gene **336**(2): 241-250.

Hoffman-Goetz, L., N. Pervaiz and J. Guan (2009). "Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF- α in intestinal lymphocytes." Brain Behav Immun **23**(4): 498-506.

Horowitz, S., D. G. Binion, V. M. Nelson, Y. Kanaa, P. Javadi, Z. Lazarova, C. Andrekopoulos, B. Kalyanaraman, M. F. Otterson and P. Rafiee (2007). "Increased arginase activity and endothelial dysfunction in human inflammatory bowel disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(5): G1323-1336.

Horvath, K., C. Varga, A. Berko, A. Posa, F. Laszlo and B. J. Whittle (2008). "The involvement of heme oxygenase-1 activity in the therapeutic actions of 5-aminosalicylic acid in rat colitis." Eur J Pharmacol **581**(3): 315-323.

Houdeau, E., R. Moriez, M. Leveque, C. Salvador-Cartier, A. Waget, L. Leng, L. Bueno, R. Bucala and J. Fioramonti (2007). "Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat." Gastroenterology **132**(3): 982-993.

Huibregtse, I. L., A. U. van Lent and S. J. van Deventer (2007). "Immunopathogenesis of IBD: insufficient suppressor function in the gut?" Gut **56**(4): 584-592.

Husain, K. (2004). "Physical conditioning modulates rat cardiac vascular endothelial growth factor gene expression in nitric oxide-deficient hypertension." Biochem Biophys Res Commun **320**(4): 1169-1174.

Ishiguro, K., T. Ando, O. Maeda, O. Watanabe and H. Goto (2010). "Novel mouse model of colitis characterized by hapten-protein visualization." Biotechniques **49**(3): 641-648.

Jackson, M. J., D. A. Jones and R. H. Edwards (1983). "Vitamin E and skeletal muscle." Ciba Found Symp **101**: 224-239.

Jansen, T. and A. Daiber (2012). "Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase?" Front Pharmacol **3**: 30.

Jenkins, N. T., R. Q. Landers, S. J. Prior, N. Soni, E. E. Spangenburg and J. M. Hagberg (2011). "Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide and superoxide in circulating CD34(+) and CD34(-) cells." J Appl Physiol (1985) **111**(3): 929-937.

Ji, L. L., R. Fu and E. W. Mitchell (1992). "Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity." J Appl Physiol **73**(5): 1854-1859.

Jones, D. P. (2006). "Redefining oxidative stress." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1865-1879.

Jung, F., L. A. Palmer, N. Zhou and R. A. Johns (2000). "Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes." Circ Res **86**(3): 319-325.

Kasimay, O., E. Guzel, A. Gemici, A. Abdyli, A. Sulovari, F. Ercan and B. C. Yegen (2006). "Colitis-induced oxidative damage of the colon and skeletal muscle is ameliorated by regular exercise in rats: the anxiolytic role of exercise." Exp Physiol **91**(5): 897-906.

Kawada, M., A. Arihiro and E. Mizoguchi (2007). "Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **13**(42): 5581-5593.

Khor, B., A. Gardet and R. J. Xavier (2011). "Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease." Nature **474**(7351): 307-317.

Kim, Y. M., H. O. Pae, J. E. Park, Y. C. Lee, J. M. Woo, N. H. Kim, Y. K. Choi, B. S. Lee, S. R. Kim and H. T. Chung (2011). "Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." Antioxid Redox Signal **14**(1): 137-167.

Klebanoff, S. J., A. J. Kettle, H. Rosen, C. C. Winterbourn and W. M. Nauseef (2013). "Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms." J Leukoc Biol **93**(2): 185-198.

Knowles, R. G. and S. Moncada (1992). "Nitric oxide as a signal in blood vessels." Trends Biochem Sci **17**(10): 399-402.

Kokura, S., N. Yoshida, T. Okuda, N. Nakabe, N. Sakamoto, Y. Isozaki, T. Hattori, O. Handa, T. Takagi, Y. Naito and T. Yoshikawa (2007). "Hyperthermia ameliorates 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats: the role of heat shock proteins." Int J Hyperthermia **23**(1): 17-28.

Kolios, G., V. Valatas and S. G. Ward (2004). "Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle." Immunology **113**(4): 427-437.

Kreiser, D., D. K. Kelly, D. S. Seidman, D. K. Stevenson, M. Baum and P. A. Dennerly (2003). "Gestational pattern of heme oxygenase expression in the rat." Pediatr Res **54**(2): 172-178.

Laughlin, M. H., D. K. Bowles and D. J. Duncker (2012). "The coronary circulation in exercise training." Am J Physiol Heart Circ Physiol **302**(1): H10-23.

Layland, J., J. M. Li and A. M. Shah (2002). "Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes." J Physiol **540**(Pt 2): 457-467.

Leffler, C. W., H. Parfenova and J. H. Jaggar (2011). "Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator." Am J Physiol Heart Circ Physiol **301**(1): H1-H11.

Leung, F. P., L. M. Yung, I. Laher, X. Yao, Z. Y. Chen and Y. Huang (2008). "Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (Part 1)." Sports Med **38**(12): 1009-1024.

Lunz, W., L. S. Capettini, A. P. Davel, C. D. Munhoz, J. F. da Silva, L. V. Rossoni, V. S. Lemos, M. P. Baldo, M. A. Carneiro-Junior, A. J. Natali, L. H. de Lacerda and J. G. Mill (2011). "L-NAME treatment enhances exercise-induced content of myocardial heat shock protein 72 (Hsp72) in rats." Cell Physiol Biochem **27**(5): 479-486.

Majzunova, M., I. Dovinova, M. Barancik and J. Y. Chan (2013). "Redox signaling in pathophysiology of hypertension." J Biomed Sci **20**: 69.

Marfe, G., M. Tafani, B. Pucci, C. Di Stefano, M. Indelicato, A. Andreoli, M. A. Russo, P. Sinibaldi-Salimei and V. Manzi (2010). "The effect of marathon on mRNA expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins and sirtuins family in male recreational long-distance runners." BMC Physiol **10**: 7.

Marini, M., R. Lapalombella, V. Margonato, R. Ronchi, M. Samaja, C. Scapin, L. Gorza, T. Maraldi, P. Carinci, C. Ventura and A. Veicsteinas (2007). "Mild exercise training, cardioprotection and stress genes profile." Eur J Appl Physiol **99**(5): 503-510.

Massion, P. B. and J. L. Balligand (2003). "Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice." J Physiol **546**(Pt 1): 63-75.

Mathur, N. and B. K. Pedersen (2008). "Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation." Mediators Inflamm **2008**: 109502.

McAllister, R. M. and E. M. Price (2010). "Effects of exercise training on vasodilatory protein expression and activity in rats." Eur J Appl Physiol **110**(5): 1019-1027.

McCafferty, D. M., M. Miampamba, E. Sihota, K. A. Sharkey and P. Kubes (1999). "Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice." Gut **45**(6): 864-873.

McCoubrey, W. K., Jr., T. J. Huang and M. D. Maines (1997). "Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3." Eur J Biochem **247**(2): 725-732.

Melo, S. F., W. Lunz, E. P. Fontes, C. M. Dias, M. A. Carneiro, Jr., A. G. Moura, R. J. Del Carlo and A. J. Natali (2009). "Different levels of Hsp72 in female rat myocardium in response to voluntary exercise and forced exercise." Arq Bras Cardiol **93**(5): 456-462.

Miethke, A., M. Feussner, G. Planitzer, H. Richter, M. Gutschmann and R. Gossrau (2003). "Localization of NOS-1 in the sarcolemma region of a subpopulation of atrial cardiomyocytes including myoendocrine cells and NOS-3 in vascular and endocardial endothelial cells of the rat heart." Acta Histochem **105**(1): 43-55.

Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman and A. O'Garra (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.

Morris, G. P., P. L. Beck, M. S. Herridge, W. T. Depew, M. R. Szewczuk and J. L. Wallace (1989). "Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon." Gastroenterology **96**(3): 795-803.

Nauseef, W. M. (2007). "Diagnostic assays for myeloperoxidase deficiency." Methods Mol Biol **412**: 525-530.

Niess, A. M., F. Passek, I. Lorenz, E. M. Schneider, H. H. Dickhuth, H. Northoff and E. Fehrenbach (1999). "Expression of the antioxidant stress protein heme oxygenase-1 (HO-1) in human leukocytes." Free Radic Biol Med **26**(1-2): 184-192.

Nunes, T. and H. S. de Souza (2013). "Inflammasome in intestinal inflammation and cancer." Mediators Inflamm **2013**: 654963.

Ostapiuk-Karolczuk, J., A. Zembron-Lacny, M. Nacz, M. Gajewski, A. Kasperska, H. Dziewiecka and K. Szyszka (2012). "Cytokines and cellular inflammatory sequence in non-athletes after prolonged exercise." J Sports Med Phys Fitness **52**(5): 563-568.

Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.

Parfenova, H. and C. W. Leffler (2008). "Cerebroprotective functions of HO-2." Curr Pharm Des **14**(5): 443-453.

Paul, G., F. Bataille, F. Obermeier, J. Bock, F. Klebl, U. Strauch, D. Lochbaum, P. Rummele, S. Farkas, J. Scholmerich, M. Fleck, G. Rogler and H. Herfarth (2005). "Analysis of intestinal haem-oxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis." Clin Exp Immunol **140**(3): 547-555.

Paul, G., V. Khare and C. Gasche (2012). "Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10." Eur J Clin Invest **42**(1): 95-109.

Pautz, A., J. Art, S. Hahn, S. Nowag, C. Voss and H. Kleinert (2010). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase." Nitric Oxide **23**(2): 75-93.

Pedersen, B. K. and M. A. Febbraio (2008). "Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6." Physiol Rev **88**(4): 1379-1406.

Pedersen, J., M. Coskun, C. Soendergaard, M. Salem and O. H. Nielsen (2014). "Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **20**(1): 64-77.

Petroff, M. G., S. H. Kim, S. Pepe, C. Dessy, E. Marban, J. L. Balligand and S. J. Sollott (2001). "Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release in cardiomyocytes." Nat Cell Biol **3**(10): 867-873.

Piotrkowski, B., C. M. Monzon, R. M. Pagotto, C. G. Reche, M. Besio, C. B. Cymering and O. P. Pignataro (2009). "Effects of heme oxygenase isozymes on Leydig cells steroidogenesis." J Endocrinol **203**(1): 155-165.

Porras, M., M. T. Martin, R. Torres and P. Vergara (2006). "Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(3): G423-430.

Pósa, A. (2008). Az ösztrogén és raloxifen közvetítette kardiovaszkuláris protektív mechanizmusok Ph.D. értekezés, Szegedi Tudományegyetem.

Posa, A., K. Kupai, R. Menesi, Z. Szalai, R. Szabo, Z. Pinter, G. Palfi, M. Gyongyosi, A. Berko, I. Pavo and C. Varga (2013). "Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase." Oxid Med Cell Longev **2013**: 521563.

Powers, S. K. and M. J. Jackson (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." Physiol Rev **88**(4): 1243-1276.

Prabhakar, N. R. (2012). "Carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H₂S) in hypoxic sensing by the carotid body." Respir Physiol Neurobiol **184**(2): 165-169.

Rafa, H., M. Amri, H. Saoula, M. Belkhelfa, O. Medjeber, A. Boutaleb, S. Aftis, M. Nakmouche and C. Touil-Boukoffa (2010). "Involvement of interferon-gamma in bowel disease pathogenesis by nitric oxide pathway: a study in Algerian patients." J Interferon Cytokine Res **30**(9): 691-697.

Rizzo, V., D. P. McIntosh, P. Oh and J. E. Schnitzer (1998). "In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association." J Biol Chem **273**(52): 34724-34729.

Rodino-Janeiro, B. K., B. Paradela-Dobarro, M. I. Castineiras-Landeira, S. Raposeiras-Roubin, J. R. Gonzalez-Juanatey and E. Alvarez (2013). "Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology." Vasc Health Risk Manag **9**: 401-428.

Saraiva, R. M., K. M. Minhas, M. Zheng, E. Pitz, A. Treuer, D. Gonzalez, K. H. Schuleri, K. M. Vandegaer, L. A. Barouch and J. M. Hare (2007). "Reduced neuronal nitric oxide synthase expression contributes to cardiac oxidative stress and nitroso-redox imbalance in ob/ob mice." Nitric Oxide **16**(3): 331-338.

Sasaki, M., S. Bharwani, P. Jordan, J. W. Elrod, M. B. Grisham, T. H. Jackson, D. J. Lefer and J. S. Alexander (2003). "Increased disease activity in eNOS-deficient mice in experimental colitis." Free Radic Biol Med **35**(12): 1679-1687.

Saxena, A., E. Fletcher, B. Larsen, M. S. Baliga, J. L. Durstine and R. Fayad (2012). "Effect of exercise on chemically-induced colitis in adiponectin deficient mice." J Inflamm (Lond) **9**(1): 30.

Scheele, C., S. Nielsen and B. K. Pedersen (2009). "ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise." Trends Endocrinol Metab **20**(3): 95-99.

Scott, J. P., C. Sale, J. P. Greeves, A. Casey, J. Dutton and W. D. Fraser (2013). "Cytokine response to acute running in recreationally-active and endurance-trained men." Eur J Appl Physiol **113**(7): 1871-1882.

Seddon, M. D., P. J. Chowienzyk, S. E. Brett, B. Casadei and A. M. Shah (2008). "Neuronal nitric oxide synthase regulates basal microvascular tone in humans in vivo." Circulation **117**(15): 1991-1996.

Sellon, R. K., S. Tonkonogy, M. Schultz, L. A. Dieleman, W. Grenther, E. Balish, D. M. Rennick and R. B. Sartor (1998). "Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice." Infect Immun **66**(11): 5224-5231.

Seta, F., L. Bellner, R. Rezzani, R. F. Regan, M. W. Dunn, N. G. Abraham, K. Gronert and M. Laniado-Schwartzman (2006). "Heme oxygenase-2 is a critical determinant for execution of an acute inflammatory and reparative response." Am J Pathol **169**(5): 1612-1623.

Sha, L., G. Farrugia, D. R. Linden and J. H. Szurszewski (2010). "The transwall gradient across the mouse colonic circular muscle layer is carbon monoxide dependent." FASEB J **24**(10): 3840-3849.

Shabeeh, H., M. Seddon, S. Brett, N. Melikian, B. Casadei, A. M. Shah and P. Chowienczyk (2013). "Sympathetic activation increases NO release from eNOS but neither eNOS nor nNOS play an essential role in exercise hyperemia in the human forearm." Am J Physiol Heart Circ Physiol **304**(9): H1225-1230.

Shi, X. Z., J. H. Winston and S. K. Sarna (2011). "Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **300**(1): G41-51.

Shotton, H. R. and J. Lincoln (2006). "Diabetes only affects nitric oxide synthase-containing myenteric neurons that do not contain heme oxygenase 2." Brain Res **1068**(1): 248-256.

Stallone, J. N. (1993). "Role of endothelium in sexual dimorphism in vasopressin-induced contraction of rat aorta." Am J Physiol **265**(6 Pt 2): H2073-2080.

Strober, W. and I. J. Fuss (2011). "Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **140**(6): 1756-1767.

Strober, W., B. R. Ludviksson and I. J. Fuss (1998). "The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease." Ann Intern Med **128**(10): 848-856.

Sun, M. W., M. F. Zhong, J. Gu, F. L. Qian, J. Z. Gu and H. Chen (2008). "Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase." Hypertens Res **31**(4): 805-816.

Szalai, Z., A. Szasz, I. Nagy, L. G. Puskas, K. Kupai, A. Kiraly, A. M. Berko, A. Posa, G. Strifler, Z. Barath, L. I. Nagy, R. Szabo, I. Pavo, Z. Murlasits, M. Gyongyosi and C. Varga (2014). "Anti-Inflammatory Effect of Recreational Exercise in TNBS-Induced Colitis in Rats: Role of NOS/HO/MPO System." Oxid Med Cell Longev **2014**: 925981.

Takagi, T., Y. Naito, K. Mizushima, Y. Nukigi, H. Okada, T. Suzuki, I. Hirata, T. Omatsu, T. Okayama, O. Handa, S. Kokura, H. Ichikawa and T. Yoshikawa (2008). "Increased intestinal expression of heme oxygenase-1 and its localization in patients with ulcerative colitis." J Gastroenterol Hepatol **23 Suppl 2**: S229-233.

Takeshita, H., M. Horiuchi, K. Izumo, H. Kawaguchi, E. Arimura, K. Aoyama and T. Takeuchi (2012). "Long-term voluntary exercise, representing habitual exercise, lowers

visceral fat and alters plasma amino acid levels in mice." Environ Health Prev Med **17**(4): 275-284.

Talapka, P., N. Bodi, I. Battonyai, E. Fekete and M. Bagyanszki (2011). "Subcellular distribution of nitric oxide synthase isoforms in the rat duodenum." World J Gastroenterol **17**(8): 1026-1029.

Tenhunen, R., H. S. Marver and R. Schmid (1968). "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase." Proc Natl Acad Sci U S A **61**(2): 748-755.

Thompson, D., S. Basu-Modak, M. Gordon, S. Poore, D. Markovitch and R. M. Tyrrell (2005). "Exercise-induced expression of heme oxygenase-1 in human lymphocytes." Free Radic Res **39**(1): 63-69.

Thomson, A. B., M. Gupta and H. J. Freeman (2012). "Use of the tumor necrosis factor-blockers for Crohn's disease." World J Gastroenterol **18**(35): 4823-4854.

Thune, I. and A. S. Furberg (2001). "Physical activity and cancer risk: dose-response and cancer, all sites and site-specific." Med Sci Sports Exerc **33**(6 Suppl): S530-550; discussion S609-510.

Thurston, R. D., C. B. Larmonier, P. M. Majewski, R. Ramalingam, M. Midura-Kiela, D. Laubitz, A. Vandewalle, D. G. Besselsen, M. Muhlbauer, C. Jobin, P. R. Kiela and F. K. Ghishan (2010). "Tumor necrosis factor and interferon-gamma down-regulate Klotho in mice with colitis." Gastroenterology **138**(4): 1384-1394, 1394 e1381-1382.

Tsiftoglou, A. S., A. I. Tsamadou and L. C. Papadopoulou (2006). "Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects." Pharmacol Ther **111**(2): 327-345.

Umar, S. and A. van der Laarse (2010). "Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart." Mol Cell Biochem **333**(1-2): 191-201.

Vallance, B. A., G. Dijkstra, B. Qiu, L. A. van der Waaij, H. van Goor, P. L. Jansen, H. Mashimo and S. M. Collins (2004). "Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(4): G865-874.

Van Geldre, L. A., N. H. Fraeyman, T. L. Peeters, J. P. Timmermans and R. A. Lefebvre (2004). "Further characterisation of particulate neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine." Auton Neurosci **110**(1): 8-18.

van Wijck, K., K. Lenaerts, J. Grootjans, K. A. Wijnands, M. Poeze, L. J. van Loon, C. H. Dejong and W. A. Buurman (2012). "Physiology and pathophysiology of splanchnic hypoperfusion and intestinal injury during exercise: strategies for evaluation and prevention." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **303**(2): G155-168.

van Wijck, K., K. Lenaerts, L. J. van Loon, W. H. Peters, W. A. Buurman and C. H. Dejong (2011). "Exercise-induced splanchnic hypoperfusion results in gut dysfunction in healthy men." PLoS One **6**(7): e22366.

Vannucchi, M. G., L. Corsani, D. Bani and M. S. Faussone-Pellegrini (2002). "Myenteric neurons and interstitial cells of Cajal of mouse colon express several nitric oxide synthase isoforms." Neurosci Lett **326**(3): 191-195.

Varga, C., F. Laszlo, P. Fritz, M. Cavicchi, D. Lamarque, K. Horvath, A. Posa, A. Berko and B. J. Whittle (2007). "Modulation by heme and zinc protoporphyrin of colonic heme oxygenase-1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat." Eur J Pharmacol **561**(1-3): 164-171.

Verwey, M., B. Robinson and S. Amir (2013). "Recording and analysis of circadian rhythms in running-wheel activity in rodents." J Vis Exp(**71**).

Voss, U., A. Lewerenz and K. Nieber (2012). "Treatment of irritable bowel syndrome: sex and gender specific aspects." Handb Exp Pharmacol(214): 473-497.

Waldner, M. J. and M. F. Neurath (2009). "Chemically induced mouse models of colitis." Curr Protoc Pharmacol **Chapter 5**: 541-546.

Wang, C., H. Yatsuya, K. Tamakoshi, M. Uemura, Y. Li, K. Wada, K. Yamashita, L. Kawaguchi, H. Toyoshima and A. Aoyama (2013). "Positive association between high-sensitivity C-reactive protein and incidence of type 2 diabetes mellitus in Japanese workers: 6-year follow-up." Diabetes Metab Res Rev **29**(5): 398-405.

Wang, W. P., X. Guo, M. W. Koo, B. C. Wong, S. K. Lam, Y. N. Ye and C. H. Cho (2001). "Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **281**(2): G586-594.

Whyte, J. J. and M. H. Laughlin (2010). "The effects of acute and chronic exercise on the vasculature." Acta Physiol (Oxf) **199**(4): 441-450.

Wienbergen, H. and R. Hambrecht (2013). "Physical exercise and its effects on coronary artery disease." Curr Opin Pharmacol **13**(2): 218-225.

Xavier, R. J. and D. K. Podolsky (2007). "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease." Nature **448**(7152): 427-434.

Xing, J. F., J. N. Sun, J. Y. Sun, C. Y. You, K. Dong, J. Lv and Y. L. Dong (2012). "Protective effects of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in rats." Dig Dis Sci **57**(8): 2045-2054.

Xiong, J., Y. H. Lin, L. H. Bi, J. D. Wang, Y. Bai and S. D. Liu (2013). "Effects of interleukin-4 or interleukin-10 gene therapy on trinitrobenzenesulfonic acid-induced murine colitis." BMC Gastroenterol **13**(1): 165.

Yukitake, H., H. Kimura, H. Suzuki, Y. Tajima, Y. Sato, T. Imaeda, M. Kajino and M. Takizawa (2011). "BTZO-15, an ARE-activator, ameliorates DSS- and TNBS-induced colitis in rats." PLoS One **6**(8): e23256.

Zanuso, S., A. Jimenez, G. Pugliese, G. Corigliano and S. Balducci (2010). "Exercise for the management of type 2 diabetes: a review of the evidence." Acta Diabetol **47**(1): 15-22.

Zhang, Q. J., Q. X. Li, H. F. Zhang, K. R. Zhang, W. Y. Guo, H. C. Wang, Z. Zhou, H. P. Cheng, J. Ren and F. Gao (2007). "Swim training sensitizes myocardial response to insulin: role of Akt-dependent eNOS activation." Cardiovasc Res **75**(2): 369-380.

Zhang, Y. H. and B. Casadei (2012). "Sub-cellular targeting of constitutive NOS in health and disease." J Mol Cell Cardiol **52**(2): 341-350.

Zhang, Y. Z. and Y. Y. Li (2014). "Inflammatory bowel disease: Pathogenesis." World J Gastroenterol **20**(1): 91-99.

Zhong, W., Z. Xia, D. Hinrichs, J. T. Rosenbaum, K. W. Wegmann, J. Meyrowitz and Z. Zhang (2010). "Hemin exerts multiple protective mechanisms and attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis." J Pediatr Gastroenterol Nutr **50**(2): 132-139.

Zhou, L. and D. Y. Zhu (2009). "Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications." Nitric Oxide **20**(4): 223-230.

Zhu, X., W. G. Fan, D. P. Li, H. Kung and M. C. Lin (2011). "Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal inflammation: a short review." World J Gastroenterol **17**(38): 4283-4288.

11. Közlemények listája

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

Szalai Z, Szász A, Nagy I, Puskás LG, Kupai K, Király A, Berkó AM, Pósa A, Strifler G, Baráth Z, Nagy LI, Szabó R, Pávó I, Murlasits Z, Gyöngyösi M, Varga C. (2014) Anti-Inflammatory Effect of Recreational Exercise in TNBS-Induced Colitis in Rats: Role of NOS/HO/MPO System. *Oxid Med Cell Longev*. 2014: 925981. doi: 10.1155/2014/925981.

IF: 3,393

Pósa A, Kupai K, Ménesi R, **Szalai Z**, Szabó R, Pintér Z, Pálfi G, Gyöngyösi M, Berkó A, Pávó I, Varga C. (2013) Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase. *Oxid Med Cell Longev*. 2013:521563. doi: 10.1155/2013/521563. **IF: 3,393**